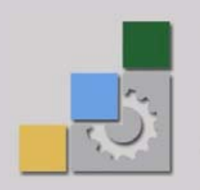


المملكة العربية السعودية
المؤسسة العامة للتدريب التقني والمهني
الإدارة العامة لتصميم وتطوير المناهج



تخصص إنتاج الدواجن

أمراض الدواجن

(عملي)

٢٦٠ دجن

طبعة ١٤٢٩ هـ

مقدمة

الحمد لله وحده، والصلاة والسلام على من لا نبي بعده، محمد وعلى آله وصحبه، وبعد:

تسعى المؤسسة العامة للتدريب التقني والمهني لتأهيل الكوادر الوطنية المدربة القادرة على شغل الوظائف التقنية والفنية والمهنية المتوفرة في سوق العمل، ويأتي هذا الاهتمام نتيجة للتوجهات السديدة من لدن قادة هذا الوطن التي تصب في مجملها نحو إيجاد وطن متكامل يعتمد ذاتياً على موارده وعلى قوة شبابه المسلح بالعلم والإيمان من أجل الاستمرار قدماً في دفع عجلة التقدم التنموي؛ لتصل بعون الله تعالى لمصاف الدول المتقدمة صناعياً.

وقد خطت الإدارة العامة لتصميم وتطوير المناهج خطوة إيجابية تتفق مع التجارب الدولية المتقدمة في بناء البرامج التدريبية، وفق أساليب علمية حديثة تحاكي متطلبات سوق العمل بكافة تخصصاته لتلبي متطلباته ، وقد تمثلت هذه الخطوة في مشروع إعداد المعايير المهنية الوطنية الذي يمثل الركيزة الأساسية في بناء البرامج التدريبية، إذ تعتمد المعايير في بنائها على تشكيل لجان تخصصية تمثل سوق العمل والمؤسسة العامة للتدريب التقني والمهني بحيث تتوافق الرؤية العلمية مع الواقع العملي الذي تفرضه متطلبات سوق العمل، لتخرج هذه اللجان في النهاية بنظرة متكاملة لبرنامج تدريبي أكثر التصاقاً بسوق العمل، وأكثر واقعية في تحقيق متطلباته الأساسية.

وتتناول هذه الحقيبة التدريبية " **أمراض الدواجن (علمي)** " لمتدربي تخصص "**إنتاج الدواجن**" في الكليات التقنية موضوعات حيوية تتناول كيفية اكتساب المهارات اللازمة لهذا التخصص.

والإدارة العامة لتصميم وتطوير المناهج وهي تضع بين يديك هذه الحقيبة التدريبية تأمل من الله عز وجل أن تسهم بشكل مباشر في تأصيل المهارات الضرورية اللازمة، بأسلوب مبسط يخلو من التعقيد، وبالاستعانة بالتطبيقات والأشكال التي تدعم عملية اكتساب هذه المهارات.

والله نسأل أن يوفق القائمين على إعدادها والمستفيدين منها لما يحبه ويرضاه؛ إنه سميع مجيب الدعاء.

الإدارة العامة لتصميم وتطوير المناهج

تمهيد

تعتبر تربية الدواجن في الآونة الأخيرة عبارة عن صناعة فقد أنشئت العديد من المشاريع التي صممت على أحدث الطرق لتوفير جميع الظروف الملائمة للنمو، وقد تم تفعيل دور التغذية في صناعة الدواجن مما أوصلها إلى مستويات جيدة وأصبحت ذات تأثير واضح على التربية، ولكن مع تعدد طرق تربية الدواجن وخاصة بالطرق المكثفة وبالتالي وضعها بأعداد هائلة في حظائر مغلقة متحكم بجميع ظروفها المحيطة، هذه الكثافات العالية أصبحت هي الطريقة المناسبة للتربية ولكن حدوث أي إصابة (مرض) سواءً فيروس أو بكتيريا أو غيره في هذه التربية يجعل من الصعب تعويض الخسارة التي سوف تنتج منها، لذا فقد أسهم علم الأمراض الخاص بالدواجن بإعطاء إنذارات وتنبهات للمريض لتوفير الحذر في التربية ومحاولةً تجنب الأمراض بمعرفة أعراضها وثم تحديد مسبباتها وطرق انتقالها وبعد تحديد ما سبق يتم وضع الطرق المناسبة للوقاية والعلاج. وانتشرت في تربية الدواجن طريقة الوقاية باستخدام التحصينات المناسبة للوقاية من حدوث الأمراض، ولعلنا في هذه الحقيبة نسلط ضوءاً ولو بسيطاً على الأمراض التي تصيب الدواجن وإعطاء مقترحات بسيطة للوقاية منها.

الأهداف العامة للحقيبة

في نهاية هذه الحقيبة التدريبية سيكون المتدرب قادراً بإذن الله على أن:

١- يعرف التدابير الصحية التي تتخذ للوقاية من أمراض الدواجن.
٢- يعرف الأمراض الفيروسية التي تصيب الدواجن من أعراضها.
٣- يعرف الأمراض البكتيرية التي تصيب الدواجن من أعراضها.
٤- يعرف الأمراض الفطرية والطفيلية والميكوبلازمية والأولية التي تصيب الدواجن من أعراضها.
٥- يحدد أهم الحالات المرضية غير المعدية في الدواجن.
٦- يتخذ الاحتياطات اللازمة لتفادي حدوث أي من الأمراض.
٧- يميز بين الحالات المرضية غير المعدية والحالات المرضية المعدية.
٨- يقترح ويشارك في وضع البرامج التحصينية .

محتوى الحقيبة :

سيتم التطرق في هذه الحقيبة التدريبية للوحدات التدريبية التالية:

الوحدة التدريبية الأولى: الأمراض الفيروسية في الدواجن.

الوحدة التدريبية الثانية: الأمراض البكتيرية في الدواجن.

الوحدة التدريبية الثالثة: الأمراض الطفيلية والفطرية والميكوبلازمية في الدواجن.

الوحدة التدريبية الرابعة: الحالات المرضية غير المعدية في الدواجن.

أمراض الدواجن

الأمراض الفيروسية

تدريب عملي رقم (١)

التدريب: الأمراض الفيروسية

الهدف :

١) التعرف على أعراض الأمراض الفيروسية

٢) تشخيص الأمراض الفيروسية

مدة التدريب :

(٥) ساعات .

الوسائل المساعدة :

- ملابس عمل مناسبة
- قلم وأوراق خاصة
- أدوات تشريح
- بيض مخصب (يحتوي على أجنة)
- شمعة كهربائية
- أدوات حقن
- طبق بتري
- مزرعة نسيجية
- أنابيب
- أجهزة تسخين
- محاليل خاصة

طريقة العمل:

أولاً : زيارة احدى المشاريع القريبة وتدوين الآتي:

- في طريقك للمزرعة تأكد من أقرب مزرعة مجاورة لها.

- عند دخولك للمزرعة راقب اجراءات التعقيم التي تتم لكم.
- عند دخولك للحظائر سجل الملحوظات التالية وناقشها مع مدربك:

١. هل حركة الطيور داخل الحظيرة هادئة؟
٢. اسأل مشرف المزرعة عن برنامجه التحصيني.
٣. هل توجد طيور نافقة؟
٤. هل الطيور في نفس العمر ومن نفس الجنس(دجاج- فري- حمام)؟
٥. هل توجد طيور مجتمعة في ركن من الحظيرة ويبدو عليها الخمول.؟
٦. هل الإضاءة داخل الحظيرة مناسبة؟
٧. هل رطوبة الحظيرة ودرجة حرارتها مناسبة.؟
٨. هل توجد رائحة واضحة داخل الحظيرة.؟
٩. هل توجد طيور لا تستطيع الحركة.؟
١٠. هل توجد طيور تصدر أصواتاً أثناء تنفسها.؟
١١. هل توجد طيور تخرج إفرازات انفية.؟
١٢. هل توجد جروح على جسم الطائر وخاصة فتحة المجمع.؟
١٣. هل توجد بثور على جسم الطائر.؟
١٤. هل تقوم الطيور بحركات غير طبيعية كهز العنق أو التواء.؟
١٥. هل يوجد أي تغير في شكل العين أو حجم الارجل.؟
١٦. اسأل مشرف المشروع هل يوجد انخفاض في إنتاج البيض أو تشوهات به.؟

بعد تسجيلك لهذه الملحوظات ناقشها مع مدربك بعد الرجوع للاعراض المرضية التي سبق دراستها.

ثانياً: قم بأخذ أحد الطيور النافقة أو التي يبدو عليها أعراض عصبية من أحد المشاريع لتشريحها وتدوين ملحوظاتك كالتالي:

- جهز مكان التشريح وخذ احتياطاتك للوقاية.
- أحضر أدوات التشريح الخاصة بك.
- افحص الطائر النافق مظهرياً وسجل ملحوظاتك الغير طبيعية على الطائر مثل (جروح – تضخم مفاصل – إفرازات أنفية - بثور .....الخ)
- قم بفتح بطن الطائر من أسفل المنقار الى منطقة المجمع اطلع على الاتي:

١. هل توجد إفرازات متجبنة أو نزيف في الحنجرة والقصبة الهوائية.؟
٢. هل توجد أي تغيرات على الرئة.؟
٣. هل توجد أي تغيرات على الجهاز الهضمي.؟
٤. انزع الغشاء المبطن للمعدة الغدية واكتب ملاحظتك.
٥. هل يوجد تضخم بالكبد والطحال.؟
٦. هل يوجد نزف في مؤخرة الطائر(فابريجس).؟
٧. هل يوجد نزف في عضلات الطائر.؟

سجل جميع ملحوظاتك وناقشها مع مدربك، وتأكد من تخلصك من الطائر لاحقاً بطريقة صحيحة.

ثالثاً: زيارة مختبر الفيروسات التابع لوزارة الزراعة بالمنطقة لمشاهدة مراحل عزل الفيروس والتأكد من التشخيص بإجراء الاختبارات اللازمة لذلك (ينصح بإجراء احداها) مثل:

- عزل الفيروس بزراعته بالبيض المخصب (الأغشية الجنينية للبيضة).
- إجراء الفحص الهستولوجي (النسيجي) كما في مرض الجدري لمشاهدة أجسام بولنيقر في سيتوبلازم الخلايا المصابة.
- إجراء اختبارات الانتشار المناعي.
- إجراء اختبار الإنزيمي المناعي (Enzyme-linked immunosorbent assay).
- إجراء الاختبارات المصلية والمناعية كاختبار التعادل الفيروسي، واختبار الترسيب .
- إجراء اختبار التلازن وعدم التلازن في كرات الدم الحمراء .

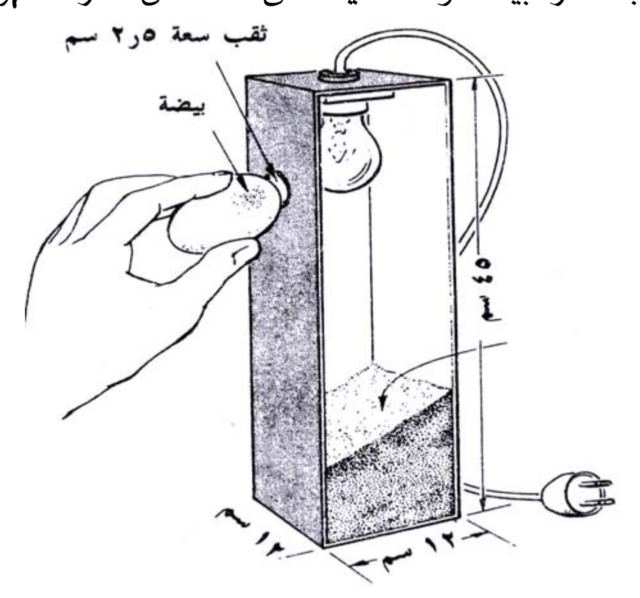
زراعة الفيروس في جنين بيض الدجاج:

الفيروسات متطفلة حتماً، ولقد كانت الطرق الأولى لتنمية الفيروسات المسببة للمرض للحيوان لأغراض الدراسة، تستخدم إما العائل الطبيعي، أو أحد الحيوانات المعملية الملائمة لزراعة الفيروسات. ولقد أظهرت الدراسات فيما بعد بخصوص زراعة فيروسات الحيوان، أن جنين الدجاج النامي يمكن استخدامه لزراعة كثير من هذه الفيروسات. ولما كانت الزراعة في جنين الطيور أكثر اقتصادية من الزراعة في حيوانات التجارب فقد استخدمت عادة في عزل وتعريف وتقدير أعداد وحفظ كثير من فيروسات الحيوان وأيضاً في إعداد اللقاحات المضادة لها. وفي هذا التدريب سوف تشاهد على أجنة الدجاج نمو فيروس مرض النيوكاسل الذي يصيب الدجاج.

طريق العمل:

١- ضع بيضتين محتويتين على أجنة في مواجهة الضوء باستخدام الشمعة الكهربائية، بحيث يكون محوراهما الطوليان أفقياً، ثم حدد بوضع علامة على موضع الغرفة الهوائية للبيضة.

عقم قشرة البيض في منطقة الغرفة الهوائية، وذلك بمسح المنطقة المعلمة بمحلول اليود مع الكحول الذي أمامك ثم عقم إبرة مقاس ١٨ بغمسها في محلول قاتل للميكروبات، ثم تعريضها للهب، واستخدمها في ثقب قشرة بيضة واحدة في أعلى نقطة من الغرفة الهوائية



شكل (٧) فحص البيضة في الضوء بواسطة الشمعة الكهربائية

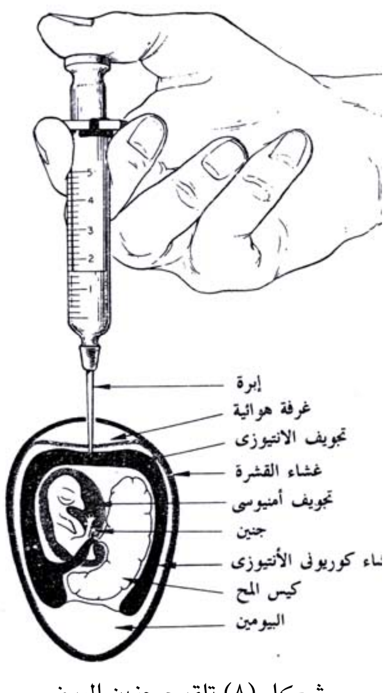
تحذير: احرص على عدم ثقب الغشاء الموجود عند قاعدة الغرفة الهوائية. وفي الدراسات التي تجري في المعمل على أعداد كبيرة من البيض، يستخدم ثاقب كهربائي لثقب القشرة.

٢- باستخدام حقنة سعة ١مل وباستخدام إبرة مقاس ٢٧ (٢سم) لقح التجويف الأنتيوزي بمعلق فيروس النيوكاسل المخفف الذي أمامك، وذلك بإدخال الإبرة عمودياً من خلال ثقب القشرة، ثم إدخال كل طول الإبرة موازية للمحور الطولي للبيضة ثم احقن ٠.٢ مل من المستحضر الفيروسي، ثم اسحب الإبرة وأغلق الثقب باستخدام مادة لاصقة أو شمع البرافين.

٣- كمقارنة.. احقن البيضة المخصبة الثانية بواسطة ٠.٢ مل محلول ملحي معقم مستخدماً الخطوات ١، ٢ ثم أغلق الثقب أيضاً بالمادة اللاصقة أو شمع البرافين.

٤- حضن البيض على درجة ٣٧م في محضن يحتوي على صوان بها ماء للمحافظة على رطوبة الجو المناسبة.

٥- افحص البيض الملقح تحت الضوء بواسطة الشمعة الكهربائية في الدرس العملي التالي، وذلك بالنسبة لموت الجنين، والذي يمكن التأكد منه بتوقف الحركة، أو اختفاء العروق من قشرة البيض. وبسبب فيروس النيوكاسل يموت الجنين خلال ٣ أو ٤ أيام بعد التلقيح. وإذا تأكدت من موت الجنين اكسر قشرة البيضة، وقم بتفريغ محتوياتها في طبق بتري آخر. قارن شكل الجنين في الحالتين، لاحظ وجود أي علامات شاذة على جنين البيضة الملقحة، مثل إصابات ووجود بقع ووجود نزيف دموي .



شكل (٨) تلقيح جنين البيض

ملحوظة: إذا حدث الموت خلال ٢٤ ساعة من التلقيح فمعنى هذا أنه حدث بسبب إصابة بكتيرية وليس بسبب فيروس مرض النيوكاسل).

تحذير: اغسل يديك جيداً بالماء والصابون بعد هذه التجربة. لا تلمس عينيك، حيث أن فيروس النيوكاسل يمكنه أن يسبب التهاباً لملتحمة العين في الإنسان.

أسئلة :

١- هل لمرض النيوكاسل أي أهمية في صناعة الدجاج.؟

٢- كيف يمكن الحصول على الفيروسات المزروعة في البيض لاستخدامها في إعداد اللقاحات؟

زراعة الفيروسات في مزارع الأنسجة :

مزارع الأنسجة عبارة عن تنمية الخلايا الحيوانية في أنبوبة اختبار. وحيث أن الخلايا النامية في مزارع نسيجية يمكن أن تعمل على نمو مختلف الفيروسات الحيوانية، فإن هذه الطريقة أصبحت أداة حديثة لاكتشاف، وتعريف، ودراسة هذه الفيروسات.

ويعتبر جنين الدجاج من أحسن مصادر الخلايا لعمل مزارع الأنسجة. ويمكن الحصول على الخلايا من أجنحة الدجاج وزراعتها كما هو موضح بالشكل .

وإذا زرعت هذه الخلايا في بيئة سائلة فإنها لا تطفو بحرية، ولكنها تلتصق بأي سطح صلب كالزجاج، أو أي وعاء من البلاستيك غير السام حيث تنمو كخلايا أحادية الطبقة(سمكها خلية واحدة) من خلايا غير متميزة عن بعضها مورفولوجياً. ورغم أن طبقة الخلايا الأحادية النامية (وهي طبقة ناتجة عن خلية واحدة) تكون واضحة للعين المجردة إلا أن مكوناتها من الخلايا تكون ميكروسكوبية ويلزم لدراستها استخدام التكبير.

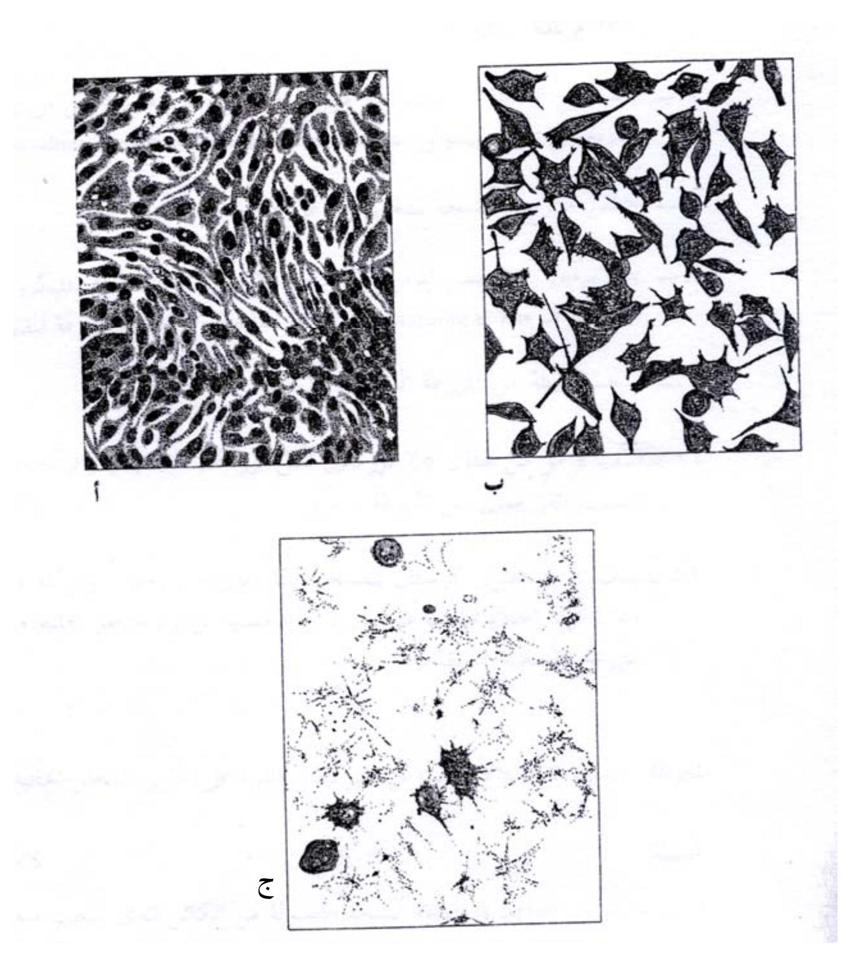
تؤدي إصابة المزارع النسيجية بالفيروس وتكاثره فيها، إلى إحداث تغيرات في خلايا العائل، يطلق عليها اصطلاح (تأثير العامل الممرض على خلايا مزارع الأنسجة.) ومثالاً على ذلك تجد أن إصابة خلايا كلية القرد بفيروس البوليو يسبب إنكماشها واستدراتها ثم تحللها أما فيروس الهربس فإنه إذا ما زرع في مزرعة نسيجية من نفس الخلايا السابقة فإنه يسبب تكون خلايا عملاقة عديدة الأنوية وتسبب بعض الفيروسات ظهور مناطق خالية من النمو في المزرعة النسيجية تشابه المناطق الخالية من النمو في حالة البكتريوفاج ولأن كل فيروس يسبب تغيرات مميزة له فإنه يمكن تعريف الفيروسات طبقاً لهذه التغيرات التي تحدثها .

هذا التدريب عبارة عن مقدمة في زراعة مزارع نسيجية من خلايا الفيبروبلاست للدجاج، وإصابتها بفيروس النيوكاسل، بهدف التعرف على التغيرات الناتجة عن هذه العدوى.

طريقة العمل:

١- افحص اثنين من مزارع الأنسجة الأحادية الطبقة الناتجة عن خلايا فيبروبلاست الدجاج التي أمامك بالميكروسكوب، وبالعين المجردة لكي تتعود على مظهرها العام. افحص لوجود غشاء خلوي واستطالة الخلايا.

٢- تحت ظروف التعقيم اسحب البيئة من كل مزرعة نسيجية بحرص، بحيث لا تسبب ضرراً للخلايا الأحادية الطبقة.



شكل (٩) خلايا فيبروبلاست الدجاج العادية والمصابة الفيروس

أ) خلايا سليمة ب) خلايا بعد ٢٤ساعة من الإصابة ج) خلايا بعد ٧٢ من الإصابة

٣- لقح بحرص ٠,٥ مل من مستحضر فيروس النيوكاسل في إحدى المزارع النسيجية، ولقح الأخرى بواسطة ٠,٥ مل محلول ملحي به منظم فوسفاتي كمقارنة. احذر أن تنفخ بشدة المزرعة النسيجية الأحادية الطبقة أثناء إضافة اللقاح.

٤- رج المزرعة رجا خفيفا لتوزيع اللقاح المضاف في خطوة رقم ٣

٥- حضن المزارع النسيجية الأحادية الطبقة، بحيث تكون الخلايا إلى أسفل، على درجة ٣٧م لمدة ساعة.

٦- بعد مرور الساعة ضف لكل مزرعة تحت شروط التعقيم ٥ مل من بيئة مزارع نسيجية محتوية على ميثيل سليولوز.

٧- حضن مزارع الأنسجة لمدة يومين على درجة ٣٧م

٨- بعد يومين افحص المزارع النسيجية الأحادية الطبقة تحت الميكروسكوب، لاحظ التغيرات في المزرعة الملقحة. قارن مع مزرعة المقارنة غير الملقحة.

٩- اسحب البيئة من المزرعة النسيجية الأحادية الطبقة.

١٠- ضف ٤ مل من محلول ٥٪ فورمالين لكل مزرعة (لحفظها) واتركه لمدة ١٠ دقائق ثم اسحب الفورمالين من المزرعة.

١١- ضف ١ مل محلول كرستال بنفسجي لكل مزرعة نسيجية، واتركه ٥ ثوان، ثم تخلص منه. اترك الخلايا المصبوغة تجف، ثم افحصها لوجود مناطق خالية من النمو في المزرعة الأحادية الطبقة.

ملحوظة: ليست كل سلالات فيروس النيوكاسل قادرة على تكوين المناطق الخالية من النمو.

أسئلة

١- ما هو الـ Explant (مزرعة أنسجة مفصولة من الكائن الذي نتجت منه) ؟

٢- كيف يمكنك استخدام مزارع الأنسجة لعد الفيروسات؟

٣- هل تستطيع كل الفيروسات إصابة كل أنواع مزارع الأنسجة؟

اختبار تثبيت العامل المكمل:

المكمل مركب بروتيني معقد يتأثر بالحرارة ويوجد في دم حيوانات الدم الحار. وهو يلعب دوراً جوهرياً في بعض التفاعلات المناعية، ففي خلال تفاعلات الأنتجن مع الجسم المضاد يثبت المكمل أو يستهلك لذلك فإن تفاعلات الأنتجن مع الجسم المضاد قد تختبر بقياس تثبيت المكمل.

ونظراً لأن ارتباط المكمل بمعقد الأنتجن والجسم المضاد لا يمكن رؤيته فإن نظاماً من الدليل يجب أن يستعمل ومن نظم الدليل الشائعة الاستعمال: كرات الدم الحمراء للأغنام، وأجسام مضادة من نوع محللات الهيم (تنتج بحقن أرنب بكرات دم حمراء للأغنام) فعندما يوجد المكمل حراً في نظام محللات هيم خلايا الأغنام تسهل رؤية تحلل كرات الدم الحمراء للأغنام.

يستفاد من نظام الدليل هذا في الطريقة المستخدمة لاختبار تثبيت المكمل لإثبات وجود أو غياب الأنتيجينات أو الأجسام المضادة المتخصصة وفي طريقة الاختبار هذه فإن الأنتجن والسيروم الذي قد يحتوي أو لا يحتوي على الجسم المضاد المتخصص، يخلطان معاً ويحضن الخليط مع كمية صغيرة من المكمل.

إذا كان الجسم المضاد المتخصص للأنتجن موجوداً فإن الأنتجن يتفاعل مع الجسم المضاد ويثبت جزءاً أو كل المكمل الموجود ثم بإضافة النظام الدليل فإن خلايا الدم الحمراء لا تحلل إلا إذا اضيفت كميات أخرى من المكمل تزيد عن الكمية التي يمكن تثبيتها ومع ذلك فإن الجسم المضاد المشتبه فيه إذا لم يكن موجوداً فإن المكمل لا يثبت، وتؤدي إضافة نظام الدليل إلى تحلل كرات الدم الحمراء.

يعتبر اختبار العامل المكمل طريقة سيرولوجية أكثر حساسية عن الطرق التي أجريتها في التدريبات السابقة وذلك للكشف عن وجود الأنتجن والجسم المضاد وتقدير تركيز كل منهما.

طريق العمل:

لتسهيل إجراء هذا التدريب فإن مشرف العملي سيعد مسبقاً التخفيفات المناسبة من محللات الهيم اللازمة للاتحاد مع معلق ٢٪ كرات دم حمراء للأغنام، كما سيعد أيضاً مكمل خنازير غينيا (٢وحدة) اللازم لتحليل نظام كرات الدم الحمراء مع محللات الهيم.

كما سيقوم مشرف العملي مسبقاً بتسخين كل من الأنتجن (سيروم الحصان) والجسم المضاد (انتيسيروم حصان مجهز في أرنب) على درجة ٥٦°م لمدة ٣٠ دقيقة لإيقاف نشاط المكمل الموجود بكليهما تجنباً من تداخله في الاختبار.

ستأخذ سيروم الحصان بتخفيف $١٠^{-٢}$ والأنتيسيروم بتخفيف مناسب وستقوم بعمل التخفيفات اللازمة في محلول ملحي منظم حموضته بالباربيتال لتزيد من حساسية الاختبار.

يحفظ المكمل المخفف في ثلاجة لحين الاستعمال ولا تأخذه من الثلاجة إلا إذا كنت جاهزاً لإضافته بالأنابيب.

١- اعمل تخفيفات متسلسلة من سيروم الحصان الموقف نشاطه، بملء ٦ أنابيب صغيرة بـ ٠,٩ مل محلول ملحي منظم بالباريتال. ضف ٠,١مل سيروم حصان تخفيف $١٠^{-٢}$ إلى الأنبوبة الأولى فيصبح التخفيف $١٠^{-٣}$ اخلط جيداً ثم بالماصة انقل ٠,١ مل من تخفيف $١٠^{-٣}$ إلى الأنبوبة الثانية لتحصل على تخفيف $١٠^{-٤}$ استمر في التخفيفات حتى تصل إلى التخفيف الأخير من $١٠^{-٨}$.

٢- رقم ١٠ أنابيب فارغة من ١ إلى ١٠ وباتباع جدول (١) ضف ٠,١ مل من كل تخفيف لسيروم الحصان الموقف نشاطه إلى الأنبوبة المناسبة ومرة ثانية حسب الجدول ضف٠,١مل من الأنتيسيروم الموقف نشاطه ثم ضف ٠,١ مل من المكمل وفي النهاية المحلول الملحي وذلك لكل أنبوبة.

٣- بسرعة حضن الأنابيب على درجة ٣٧° م في حمام مائي لمدة ساعة.

٤- في أنبوبة اخلط ١,٥ مل من معلق ٢٪ كرات دم الأغنام الحمراء بـ ١,٥ مل من الهيموليسين ضع الأنبوبة في الثلاجة لحين الاستعمال.

جدول (١) النظام المتبع في اختبار تثبيت المكمل

رقم الأنبوبة	سيروم حصان موقف نشاطه (٠,١مل)	أنتيسيروم موقف نشاطه (مل)	مكمل (٢وحدة)	محلول ملحي منظم بالباربيتال (مل)
١	$١٠^{-٣}$	٠,١	٠,١	-
٢	$١٠^{-٤}$	٠,١	٠,١	-
٣	$١٠^{-٥}$	٠,١	٠,١	-
٤	$١٠^{-٦}$	٠,١	٠,١	-
٥	$١٠^{-٧}$	٠,١	٠,١	-
٦	$١٠^{-٨}$	٠,١	٠,١	-
٧	$١٠^{-٣}$	-	٠,١	٠,١
٨	-	٠,١	٠,١	٠,١
٩	-	-	٠,١	٠,١
١٠	-	-	-	٠,١

٥- بعد تحضين الأنابيب (الخطوة رقم ٣) لمدة ساعة في الحمام المائي ضف لكل أنبوبة ٠,٢ مل من نظام دليل كرات الدم الحمراء مع الهيموليسين الذي أعددته بالخطوة رقم ٤. حضن على درجة ٣٧ $^{\circ}$م لمدة ٣٠ دقيقة.

٦- افحص الأنابيب من ٧ إلى ١٠ أنابيب مقارنة .

- تختبر الأنبوبة رقم ٧ للعوامل المضادة في سيروم الحصان التي تعوق المكمل وتمنعه من تحليل كرات الدم الحمراء.
- تختبر الأنبوبة رقم ٨ لنفس العوامل الموجودة في الأنتيسيروم.
- تبين الأنبوبة رقم ٩ أن كمية المكمل المستعملة كافية لتحليل كرات الدم الحمراء المتأثرة

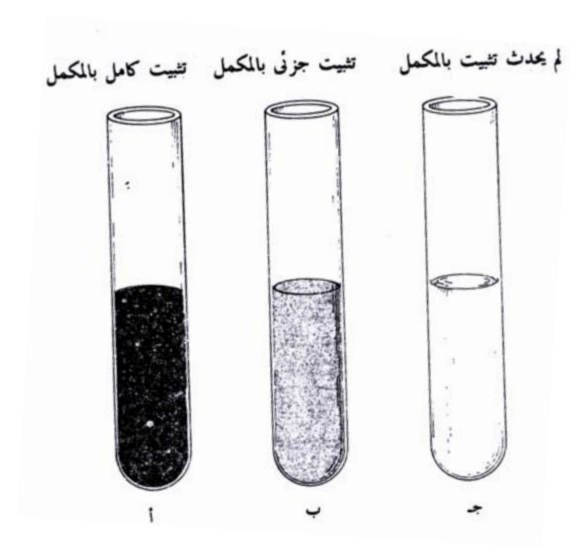
- تبين الأنبوبة رقم ١٠ أن كرات الدم الحمراء المتأثرة لا تحلل بدون المكمل أو في وجود المحلول الملحي.

يجب أن تحلل الأنابيب ٧ ، ٨ ، ٩ بالكامل إذا كانت الأنظمة تعمل بكفاءة ، افحص باقي الأنابيب أي فهل تحلل بالكامل أو تححل جزئياً أو تلك التي لم يحدث بها تحلل.

عدم وجود تحلل لكرات الدم الحمراء يعني حدوث تثبيت بالمكمل، ويرمز لذلك في التقريرب ++++

يعني التحلل الكامل عدم حدوث تثبيت، أي أن الاختبار سالب ويرمز لذلك في التقرير بـ - أو صفر.

تسجل باقي الأنابيب نتائجها حسب كمية التحلل الذي حدث بها.



شكل (١٠) درجات التثبيت بالمكمل

أ) لا يوجد تحلل لكرات الدم الحمراء.

ب) تحلل لبعض كرات الدم الحمراء.

ج) تحلل لجميع كرات الدم الحمراء.

في هذه التجربة يمكن تقدير تركيز الأنتجن ويعبر عنه بمقلوب التخفيف للأنبوبة التي تقع مباشرة قبل الأنبوبة التي حدث بها تحلل كامل.

أسئلة:

١- اشرح كيف تعمل كل أنبوبة مقارنة للتأكد من اختبار تثبيت المكمل؟

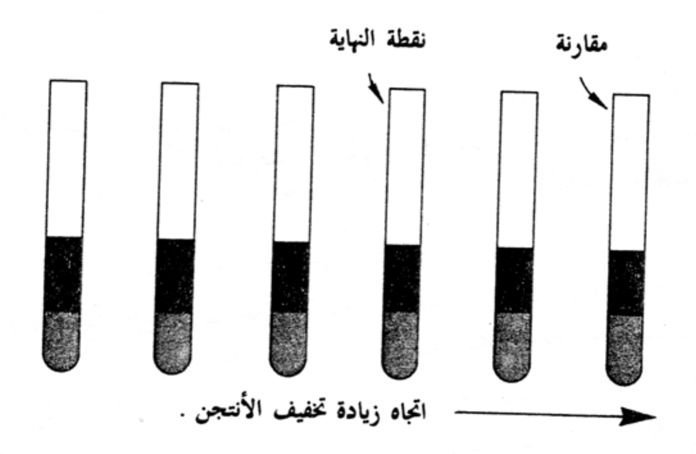
٢- ما هي الأجسام المضادة من نوع محللات الهيم؟

٣- يسمى اختبار تثبيت المكمل المستعمل عادة في الكشف عن مرض الزهري باسم اختبار.........

٤- يوقف نشاط السيروم المستعمل في اختبار تثبيت المكمل، بتسخينه على درجة ٥٦م لمدة ٣٠ دقيقة وذلك للتخلص من ....

اختبار الترسيب:

يختلف تفاعل الترسيب عن تفاعل التجمع الذي درس في التدريب السابق ففي التجمع نجد أن الانتجينات عبارة عن جزء من التركيب الكامل للخلايا، وتتفاعل معها الأجسام المضادة المتخصصة، فيحدث تجمع للخلايا. إما في تفاعل الترسيب فإن الأنتجن الذائب يتفاعل مع الجسم المضاد المتخصص له ليكون راسبا يمكن رؤيته



شكل (٣) اختبار حلقة الترسيب

في أبسط اختبارات الترسيب المسمى باختبار حلقة الترسيب فإن جزءا صغيرا من الأنتجن يوضع بعناية في أنبوبة في شكل طبقة، من محلول سيروم يحتوي على الأجسام المضادة إذا كان من الأنتجن والجسم المضاد متشابهين، أي أن كلاً منهما متخصص للآخر فإن راسبا أو حلقة تتكون في منطقة التقابل نتيجة انتشار كل من المادتين في الأخرى. ويمكن أيضا إجراء اختبار الترسيب في أنابيب شعرية للتوفير من مواد التفاعل المرتفعة الثمن. وعند استعمال طريقة الأنابيب الشعرية يسحب أولا السيروم المضاد (وهو سيروم

يحتوي على أجسام مضادة) الأنتيسيروم يسحب بالأنبوبة الشعرية حتى يتجمع في طبقة فوق مستخلص الأنتجن.

في هذا التدريب ستقوم بعمل اختبار حلقة الترسيب باستعمال سيروم الحصان كأنتجن، وانتيسيروم الأرنب الذي يحتوي على أجسام مضادة متخصصة.

طريقة العمل:

إن أنتجن أ الذي ستستعمله مخفف ١٠/١ والأجسام المضادة مخففة ٢/١.

١- أعمل ٤ تخفيفات عشرية متسلسلة للأنتجن أ ، بنقل ٠,١مل من الأنتجن لأنبوبة اختبار بها ٠,٩مل محلول ملحي، اخلط جيدا بماصة نظيفة. ثم أنقل ٠,١مل من هذا التخفيف إلى الأنبوبة الثانية المحتوية على ٠,٩مل محلول ملحي وهكذا بذلك سيكون لديك تخفيفات ١٠⁻١ ، ١٠⁻٢ ، ١٠⁻٣ ، ١٠⁻٤ ، ١٠⁻٥

٢- باستعمال ماصة باستير، انقل تخفيفات الأنتجن الخمسة إلى خمس أنابيب ترسيب محتوية على السيروم المضاد. ضع الأنتجن بعمق ٤مم ليكون طبقة فوق الأنتيسيروم. يمكن استعمال نفس الماصة إذا نقلت أولا التخفيف الأعلى، والتخفيف الأقل أخيرا.

ملحوظة: يجب إضافة كل محاليل الأنتجن بعناية بسكبها على جانب الأنبوبة لمنع خلطها بالسيروم. رقم الأنابيب وأطمرها في قالب من الطمي.

٣- أفحص الأنابيب لتكون مناطق ترسيب بعد ١ ، ٥ ، ١٠ ، ٣٠ دقيقة. سجل أعلى تخفيف من ا لأنتجن أعطى منطقة ترسيب.

هذا الأختبار إثبات نوعي لتفاعل الأنتجن مع الجسم المضاد ، وكذلك للعلاقات الكمية المحدودة ونظرا لأن تركيز الأنتيسيروم ثابت في الاختبار فإن كمية الراسب بالسيروم أي درجة تركيزه يمكن أن يعبر عنها بمقلوب أكبر تخفيف من ا لأنتجن أعطى راسبا.

أسئلة:

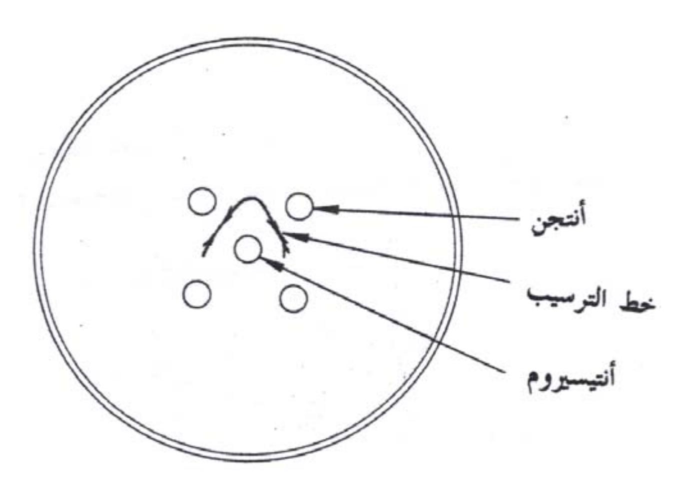
١- ما هو تركيز الأنتجن الذي اختبرته.

٢- ما هي الطرق الأخرى التي يمكن استخدامها لإجراء اختبارات الترسيب؟

طريقة الانتشار المناعي: طبق اوكترلوني

يمكن استعمال الجل لدراسة تفاعل الترسيب، عندما يوضع الأنتجن والجسم المضاد له في مساحات متجاورة على جل (مثل طبق آجار) فإن كلا منهما ينتشر في الآخر، ويحدث تفاعل ترسيب يمكن رؤيته كمنطقة معتمة.

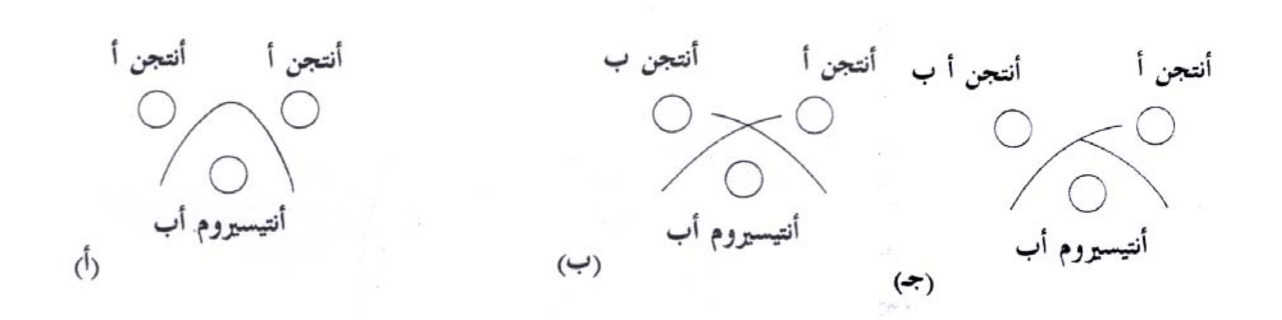
تعتبر طريقة أوكترلوني من أكثر طرق الانتشار المناعي استعمالا في هذه ا لطريقة.. يوضع الأنتيسيروم في تجويف يحفر بمركز طبق آجار نقي، وتوضع الأنتيجنات الذائبة في سلسة تجاويف حول محيط طبق الآجار. إذا كانت الأجسام المضادة الموجودة بالسيروم متخصصة للأنتيجينات المختبرة، فإن خطا معتما (أو خطوطا) من الراسب تتكون بالآجار، بين التجاويف المحتوية على الأنتجن والسيروم المضاد.



شكل (٤) تكوين الراسب بين الأنتجن والأنتيسروم المتخصصين

يعتمد الوقت اللازم لتكون هذه الخطوط على تركيز كل من الأنتجن والجسم المضاد وبالتالي يعتبر مقياسا. بملحوظة خطوط الترسيب.. فإنه يمكن معرفة إذا كانت الأنتيجينات المختلفة ذات مكونات أنتيجينية مشتركة أم لا. وكما هو موضح بالشكل التالي فإنه إذا كانت الأنتيجينات المتشابهة في التركيب في تجاويف متقاربة مع السيروم المضاد الذي بالتجويف المركزي، فإن خطوط الترسيب المتكونة، تتصل ببعضها لتكون خطا واحدا مستمرا.

إذا استعمل اثنان من الانتيجينات المختلفة في المكونات الأنتيجينية فإن الخطين المتكونين يكونان غير مرتبطين، متقاطعين ولهما نتؤين.



شكل (٥) أنواع التسيب في أطباق أوكرلوني

أ- تفاعل يمكن تعريفه.

ب- تفاعل غير ممكن تعريفه.

ج- تفاعل يمكن تعريفه جزئيا.

إذا استعمل اثنان من الانتيجينات، يشتركان في بعض المكونات ويختلفان في البعض الآخر، فإن التفاعل يعطي خطين متقاطعين، ولكن لهما نتوءا واحدا يمتد نحو الأنتجن الأضعف.

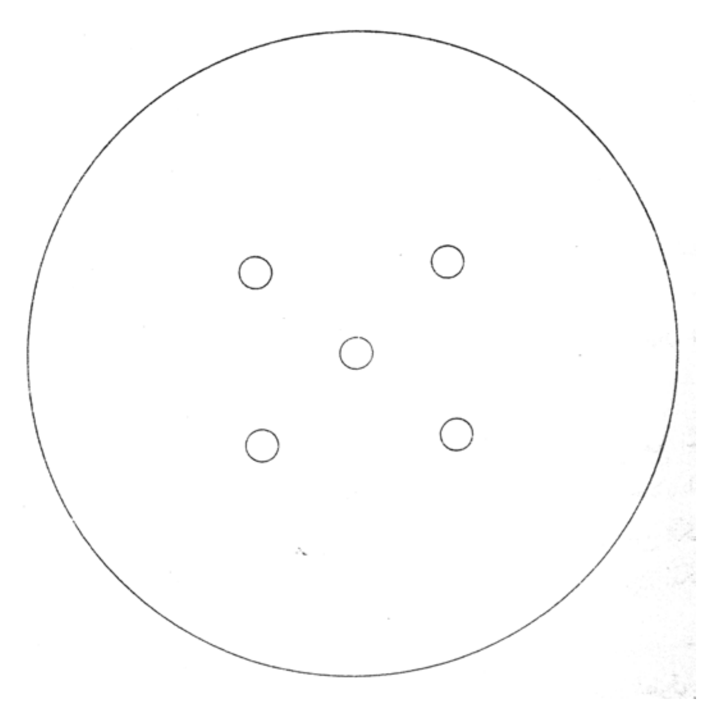
طريقة العمل:

١- سيأخذ كل طالب، طبق آجار أوكترلوني. أحفر عدد ٥ تجاويف بالطبق بثاقبة فلين مقاس ٢ متبعا النظام الموجود بشكل بوضع الطبق مباشرة على الشكل واستخدم الشكل كدليل.

٢- استعمل جهاز الشفط لسحب الآجار من التجاويف المحفورة.

٣- املء التجويف المركزي بانتيسيروم حصان مجهز في أرنب املء كل تجويف من التجاويف الأربعة المحيطة بأنتجن مختلف من الأنتيجينات الأربعة المعطاه لك.

٤- حضن الأطباق غير مقلوبة على درجة ٣٧م. أفحص الأطباق كل يوم لمدة ٧ أيام لتكون خطوط الترسيب.



شكل (٦) قالب لعمل التجاويف في أطباق أوكترلوني.

أسئلة:

١- كيف تفسر وجود أكثر من خط ترسيب بين التجويف المركزي وأحد التجاويف الخارجية المحتوية على الأنتجن؟

٢- ما هي الهجرة الكهربائية المناعية؟

٣- لماذا لا تنمو الميكروبات الملونة، على طبق أوكترلوني أثناء التحضين ؟

٤- أي الأنتيجينات تأتي من سيروم الحصان؟

عد الفيروسات

طريقة تجمع الهيم

يستطيع كثير من الفيروسات تجميع كرات الدم الحمراء التابعة لمختلفة أنواع الحيوانات. ويقوم الفيروس باستخدام الزوائد المدببة المسؤولة عن تجمع الهيم بالارتباط بمناطق الاستقبال الخاصة (وهي عبارة عن ميكوبروتين يحتوي على حامض استيل نوراminيك في الطرف) في كرتين دم حمراء في وقت واحد مكونا رابطة بينهما. وعند وجود تركيز عال من الفيروس تتكون روابط تكفي لتكون تجمعات كبيرة من كرات الدم الحمراء، والتي يمكن ملحوظة تكونها بشكل التجمع في قاع أنبوبة اختبار صغيرة.

تكون الخلايا غير المرتبطة حلقة، تسقط إلى قاع الأنبوبة وتدور في وسطها في شكل زرار. أما الخلايا المتجمعة المرتبطة .. فإنها تتراكم وتترسب في القاع ولكنها لا تدور مكونة طبقة رقيقة من الخلايا الراسبة ذات حافة غير منتظمة مشرشرة.

ولاختبار تجمع الهيم بواسطة الفيروس، تعمل تخفيفات عشرية من معلق الفيروس، ويتم خلط كل منها مع معلق معلوم التركيز من خلايا الدم الحمراء (تركيز $١٠^{٧}$ /مل) وفي هذا التقدير الكمي نجد أن مقلوب أقصى تخفيف أعطى أعلى تجمع كامل للهيم، يعتبر معادلا لعدد الفيروسات في العين ةالأصلية. وهذه الطريقة غير دقيقة لأن عملية التخفيفات، والعدد الذي نحصل عليه يعتبران نسبيان فهي في الحقيقة لا تقدر العدد المطلق لحبيبات الفيروس الموجودة، وكنها تقدر عدد الوحدات المسببة لتجمع الهيم.

وهناك عدد من العوامل التي تؤثر على العدد الناتج من طريقة تجمع الهيم فمثلا نجد أن السوائل البيولوجية مثل الدموع أو اللعاب ترتبط بالفيروسات، وتجعلها غير حرة لترتبط مع كرات الدم الحمراء. كما أن حجم وشكل واتجاه الوعاء الذي يحتوي على الفيروس وكرات الدم الحمراء يؤثرون على نتائج العد، أو تجعل من الصعب التأكد من النتائج وفي العادة تستخدم أنابيب ١٣×١٠٠ مم ليس لها بروز من الزجاج بقاع الأنبوبة تحتوي على ١مل من المحلول الكلي وقد وجد أن استخدام حجم أكبر من المحلول في أنبوبة بهذا الحجم يؤخر حدوث الترسيب كما يجب ضبط أعداد كرات الدم الحمراء بدقة، إما بعمل

تحليل لكمية منها ، ثم قياس كمية الهيموجلوبين في ناتج التحلل باستخدام جهاز قياس الألوان الضوئي أو بعمل طرد مركزي على سرعة معينة لكمية منها في أنبوبة طرد مخروطية مدرجة ، ثم تخفيف كمية مناسبة من الراسب يعتمد على كمية الخلايا الراسبة.

طريقة العمل:

يلاحظ أن الفيروس المستخدم في هذا التدريب قد تم قتله بالتسخين على درجة ٥٦م لمدة ٣٠ دقيقة.

١- أعمل تخفيفيات متضاعفة من فيروس النيوكاسل كالآتي: ضف ٠,٥مل من المحلول الملحي إلى ٠,٥مل من معلق الفيروس الذي أمامك. أخلط جيدا ، ثم أنقل من المخلوط ٠,٥ مل إلى أنبوبة جديدة وكرر العمل من خلال خمس أنابيب تخفيفات (تحصل على تخفيفات تتراوح بين ١ : ٢ حتى ١ : ٣٢). استبعد ٠,٥مل من أخر أنبوبة تخفيف حتى تتساوى الحجوم، واترك أنبوبة سادسة تحتوي على محلول ملحي فقط كمقارنة.

٢- ضف ٠,٥مل من معلق ٢٥٪ كرات دم حمراء مأخوذة من الدجاج، إلى كل من الأنابيب الستة السابقة. أخلط جيدا ثم أتركها ثابتة.

٣- حضن الأنابيب على درجة حرارة الغرفة لمدة ٣٠ : ٦٠ دقيقة.

وبدون أن يحدث أي رج للأنابيب، تتبع عملية ترسيب كرات الدم الحمراء في أنبوبة المقارنة ، حتى يصل خط الترسيب لقاع الأنبوبة المنحني. أرفع حامل الأنابيب بهدوء إلى أعلى رأسك. أو ضعه فوق مرآة ، ثم أفحص نظام التجمع في قاع الأنابيب. وبمجرد أن تكون أنبوبة المقارنة تجمعا لكرات الدم يشبه الزر ، حدد آخر أنبوبة من سلسلة الأنابيب التي أعطت طبقة منتظمة ناعمة من الخلايا في القاع، وسجل مقلوب تخفيف هذه الأنبوبة على أنه يمثل عدد الفيروسات.

يتبع فيروس النيوكاسل المستخدم في هذه الدراسة مجموعة ويسبب مرضا بالجهاز التنفسي في الدجاج. وزيادة عدد هذا الفيروس في السيرم تعتبر دليلا على إصابة القطيع. وهذا الفيروس ينتج إنزيم وهو الإنزيم الذي يحلل مناطق استقبال الفيروس في كرات الدم الحمراء ، مما يسبب انفصال

الفيروس عن كرات دم حمراء جديدة ولكن كرات الدم الحمراء المنفصلة عن الفيروس لا يمكن استخدامها ثانية للتجميع مع فيروس نظرا لتحلل مناطق استقبال لفيروسات أخرى، بحيث يمكن استخدامها في دراسات تجمع هيم لفيروسات أخرى تابعة لنفس العائلة وهذه الطريقة تسمى طريقة تدرج مناطق الاستقبال والتي يمكن استخدامها في تعريف الفيروسات.

ويلاحظ أن تسخين الفيروس يفقده القدرة على إنتاج الإنزيم الذي يحطم مناطق الاستقبال، وبهذا فإنه لا ينفصل عن كرات الدم الحمراء .

أسئلة :

١- لماذا يترك الفيروس وكرات الدم الحمراء ليتفاعلا لمدة ساعة واحدة فقط؟

٢- بأي طرقة أخرى خلاف الحرارة.. يمكن منع الإنزيم الذي يحطم مناطق اتصال الفيروس بكرات الدم الحمراء من العمل؟

٣- ماذا يمكن أن يحدث لو تواجدت الأجسام المضادة لفيروس NDV أثناء التجربة؟

٤- صف كيف يمكن استخدام طريقة تدرج مناطق الاستقبال في تعريف الفيروسات؟

٥- كيف يمكن أن يؤدي وجود أعداد زائدة من كرات الدم الحمراء إلى التأثير على نتائج العد بطريقة تجمع الهيم.

أمراض الدواجن

الأمراض البكتيرية

تدريب عملي رقم (٢)

التدريب: البكتيريا

الهدف :

٣) التعرف على الأمراض البكتيرية

٤) تشخيص الأمراض البكتيرية

٥) القدرة على إجراء المقارنات بين الأمراض البكتيرية من خلال الأعراض.

مدة التدريب :

(١٢) ساعة.

الوسائل المساعدة :

- ملابس عمل مناسبة
- قلم وأوراق خاصة
- أدوات تشريح
- بيض مخصب (يحتوي على أجنة)
- شمعة كهربائية
- أدوات حقن
- طبق بتري
- مزرعة نسيجية
- أنابيب
- أجهزة تسخين
- محاليل خاصة
- صبغات خاصة
- قضيب زجاجي

- شريحة
- إبرة تلقيح
- لهب

طريقة العمل:

اولاً: زيارة احدى المشاريع القريبة وتدوين الاتي:

- في طريقك للمزرعة تاكد من اقرب مزرعة مجاورة لها.
- عند دخولك للمزرعة راقب اجراءات التعقيم التي تتم لكم.
- عند دخولك للحظائر سجل الملحوظات التالية وناقشها مع مدربك:

١٧. هل حركة الطيور داخل الحظيرة هادئة.

١٨. هل يوجد طيور نافقة.

١٩. هل يوجد اسهال وما لونه.

٢٠. هل الطيور في نفس العمر ومن نفس الجنس(دجاج- فري- حمام)

٢١. هل يوجد طيور مجتمعة في ركن من الحظيرة ويبدو عليها الخمول.

٢٢. هل الاضاءه داخل الحظيرة مناسب.

٢٣. هل رطوبة الحظيرة ودرجة حرارتها مناسبة.

٢٤. هل توجد رائحة واضحة داخل الحظيرة.

٢٥. هل توجد طيور لا تستطيع الحركة ويظهر عليها الهزال.

٢٦. هل توجد طيور تصدر اصوات اثناء تنفسها.

٢٧. هل توجد طيور تخرج افرازات انفية.

٢٨. هل توجد جروح على الطائر أو تضخم للراس أو الداليتان أو تغير لونها.

٢٩. هل يوجد بثور على جسم الطائر.

٣٠. هل يوجد أي تغير في شكل العين أو حجم الارجل.

٣١. اسأل مشرف المشروع هل يوجد انخفاض في إنتاج البيض أو تشوهات به.

٣٢. هل يوجد قوراض أو قراد في الحظائر.

٣٣. هل مقدمة الطائر (صدره) سليم.

٣٤. هل الريش طبيعي أو منتفش.

بعد تسجيلك لهذه الملحوظات ناقشها مع مدربك بعد الرجوع للاعراض المرضية التي سبق دراستها.

ثانياً: قم باخذ احد الطيورالهزيله أو التي تظهر عليها اعراض مرضية من احد المشاريع لتشريحها وتدوين ملحوظاتك كالتالي:

- جهز مكان التشريح وخذ احتياطاتك للوقاية.
- احضر ادوات التشريح الخاصة بك.
- افحص الطائر النافق مظهرياً وسجل ملحوظاتك الغير طبيعية على الطائر مثل (جروح – تضخم مفاصل – افرازات انفية - بثور .....الخ)
- قم بفتح بطن الطائر من اسفل المنقار الى منطقة المجمع اطلع على الاتي:

٨. هل يوجد افرازات أو نزيف في الحنجرة والقصبه الهوائية.

٩. هل يوجد أي تغيرات على الرئة.

١٠. هل يوجد أي تغيرات على الجهاز الهضمي.

١١. هل يوجد تضخم بالكبد والطحال أو اشكال مميزه.

١٢. افحص اكياس البيض.

١٣. هل يوجد طفيليات خارجية على جسم الطائر.

١٤. فحص مؤخرة الطائر وتسجيل التغيرات.

١٥. فحص قناه البيض.

١٦.فحص حجم راس الطائر.

سجل جميع ملحوظاتك وناقشها مع مدربك، وتاكد من تخلصك من الطائر لاحقاً بطريقة صحيحة.

ثالثاً: زيارة مختبر البكتيريا التابع لوزارة الزراعة بالمنطقة لمشاهدة مراحل تشخيص البكتيريا والتأكد من التشخيص بإجراء الاختبارات اللازمة لذلك (ينصح بإجراء احداها) مثل:

١.فحص البكتيريا الحية.
٢.زراعة البكتيريا.
٣.صبغ البكتيريا (قاعدية – حامضية).

فحص البكتيريا الحية **Examination of living bacteria**

كثير من أنواع البكتيريا الحية سريعة الحركة ونظرا لأنه من الصعب فحص البكتيريا غير المصبوغة لأن الخلايا البكتيرية عديمة اللون ودرجة تباينها عن الوسط الذي تعيش فيه طفيفه إلا أنه يمكن رؤية البكتيريا ومشاهدة حركتها باستعمال التحضيرات المبتلة والنقطة المعلقة Hanging-drop preparations كما ستفصل في الطريقة التالية:

افحص العرض الخاص بالبكتيريا الحية المتحركة وغير المتحركة التي أعدها مشرف المعمل ثم جهز تحضيرات من المزارع المقدمة لك ولاحظ الحركة.

طريقة العمل

١. جهز تحضيرات بالطريقة المبتلة من مزارع

Pseudomonas aeruginosa, bacillus cereus, enterobacter aerogenes.

وذلك بوضع نقطة من كل مزرعة على كل شريحة بواسطة الإبرة ذات العقدة – بعد التغطية بغطاء الشريحة افحص الحركة بالعدسة الزيتية.

٢. جهز من نفس المزارع تحضيرات بطريقة النقطة المعلقة :

- ضع بواسطة قضيب زجاجي رفيع فازلين حول تجويف شريحة النقطة المعلقة.
- بواسطة إبرة التلقيح ذات العقدة المعقمة انقل مقدار نقطة واحدة من المزرعة وضعه في وسط غطاء الشريحة النظيفة.
- اقلب الشريحة ذات التجويف على غطاء الشريحة بحيث تقع نقطة المزرعة وسط تجويف الشريحة دون أن تلمسها وبالضغط الخفيف على جوانب غطاء الشريحة يلتصق الغطاء بالشريحة نتيجة لوجود الفازلين.

٣. بسرعة وعناية اقلب الشريحة ليكون الغطاء إلى أعلى والنقطة معلقة في وسط التجويف. لا تدع النقطة تسقط أو تلمس قاع التجويف.

٤. لفحص النقطة المعلقة ... عدل أولاً موضع النقطة بحيث ترى حافتها في وسط مجال النظر – كخط لامع متموج على خلفية رمادية – وذلك بتحريك الشريحة واستعمال القوة الصغرى وتقليل الضوء الداخل إلى الميكروسكوب بواسطة الحجاب.

انقل إلى القوة الكبرى ثم إلى الزيتية بتحريك القطعة الأنفية.

استعمل الضابط الدقيق حتى ترى حافة النقطة المعلقة بوضوح حيث تستطيع مشاهدة البكتيريا بحركتها وتباينها عن الوسط المحيط بها ، كما يراعى الاحتراس في التمييز بين الحركة الحقيقة والحركة البراونية. افحص العرض المجهز للحركة بواسطة الميكروسكوب المتباين الأطوار الضوئي.

أسئلة : **Questions**

١- لماذا تضبط الرؤية أولاً على حافة النقطة المعلقة ولا تضبطها مباشرة على البكتيريا المعلقة بالنقطة؟

٢- لا تعود الحركة في كل أنواع الكائنات الدقيقة المتحركة إلى الفلاجلات ما هي أنواع الحركة الأخرى التي تستطيع وصفها؟

المزرعة السائلة (البويون، المرق) Broth Culture

الطريقة السهلة لتداول البكتيريا هي تنميتها في مزرعة سائلة بأنبوبة اختبار وتوجد تركيبات عديدة للمزارع السائلة وكلها تعتمد على البكتيريا التي يرغب في تنميتها عموما فإن كل المزارع السائلة يجب أن توفر للبكتيريا النامية الوسط الفيزيائي والكيميائي المناسب والعناصر الغائية اللازمة وذلك في محلول مائي.

يظهر النمو في المزرعة السائلة بطرق مختلفة:

١- تعكير Turbidity :

حيث يكون النمو في المزرعة السائلة على شكل سحابة مختلفة الكثافة.

٢- تكون غشاء على السطح Pellicle Formation :

حيث تطفو على سطح المزرعة السائلة كتلة صغيرة من الخلايا.

٣- راسب Sediment :

حيث توجد الخلايا راسبة في قاع أنبوبة المزرعة السائلة وتتحرك لأعلى بالطرق الخفيف بالإصبع على الأنبوبة.

زراعة البكتيريا:

توجد الكائنات الحية الدقيقة في الطبيعة، في مجتمعات خليطة من أنواع عديدة متباينة، ومع ذلك فإن ما توصلنا إليه من معلومات في الميكروبيولوجي، جاء من دراسة الأنواع المعزولة النامية في وسط خال من أي تلوث بالكائنات الأخرى. مثل هذه الطرق من الدراسة الفريدة في نوعها، لا تستعمل عادة في دراسة النباتات والحيوانات الراقية، ولكنها خاصة فقط بالدراسات المتعلقة بعالم الميكروبات.

تتطلب الكائنات الحية الدقيقة مثل كل الكائنات الحية وسطا مناسبا للنمو به المغذيات المناسبة.

أولا: يجب أن تحتوي البيئة المزرعية على العناصر الغذائية اللازمة لنمو المزرعة الميكروبية

ثانيا: يجب أن توفر هذه البيئة في نفس الوقت، وسطا مناسبا من حيث الرقم الأيدروجيني، الضغط الأسموزي، الأكسجين الجوي.. وغيرها. وإذا ما فكرنا في عدد المواد المختلفة التي تستطيع الميكروبات أن تتلفها، فإنه سيتبين لنا أن مواد عديدة مختلفة تصلح كبيئة مزرعية. وعموما فإن البيئات المزرعية من حيث الشكل تقسم إلى نوعي: بيئات سائلة(أو مرق أو بويون) وبيئات صلبة.

نظرا لأن معظم دراستنا المعملية ستتم باستعمال مزرعة نقية من الميكروبات، أي على نوع واحد من الكائنات الدقيقة فإنه يجب أن نكون قادرين على تعقيم البيئة والاحتفاظ بها في صورة معقمة خالية من أي نوع من أنواع الكائنات. كما يجب أن نكون قادرين على تلقيح هذه البيئة المعقمة بمزرعة نقية للميكروب دون حدوث أي تلوث من الخارج. وتعرف الخطوة الأخيرة باسم طرق منع التلوث.

نظرا لأن أي بيئة بعد تحضيرها تحتوي على كائنات دقيقة آتية من المكونات الداخلة في تركيب البيئة، أو من سطوح الأواني والأدوات المستعملة لذلك فإن البيئة يجب أن تعقم، أي تعامل بالحرارة، أو بوسائل أخرى مناسبة لإبادة كل الميكروبات الموجودة بها، وإلا فإن البيئة ستحتوي على خليط من الكائنات الدقيقة. وقبل إجراء عملية التعقيم فإن الأنابيب المحتوية على البيئة يجب أن تعطي بسدادات من القطن أو بغطاء محو مناسب من البلاستيك أو المعدن لابد أن يمنع هذا الغطاء دخول كائنات جديدة تلوث البيئة وفي نفس الوقت يسمح بتبادل الهواء أو الغازات.

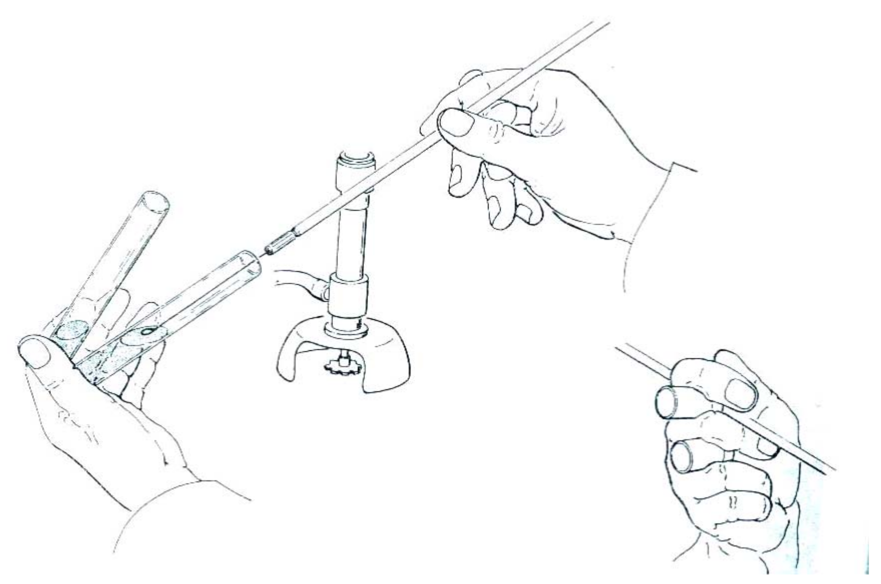
ولكي تنمو المزرعة البكتيرية في البيئة المعقمة، فإن عددا من خلايا البكتيريا يسمى باللقاح ينقل إلى البيئة بواسطة إبرة التلقيح (عملية التلقيح Inoculation) مع أخذ الاحتياطات المناسبة للمحافظة على نقاء المزرعة ونظرا لأن عددا كبيرا من الميكروبات ينقل مع إبرة التلقيح إلى المزرعة، فليس هناك ما يدعو إلى هز الإبرة بالمزرعة.

وعند عملية التلقيح، يجب أن تسخن الإبرة المستعملة في نقل الميكروبات على الفور قبل وبعد النقل وذلك بواسطة اللهب لدرجة الاحمرار. هذا التسخين لدرجة الاحمرار سيبيد كل الكائنات الحية الموجودة على سطح الإبرة. امسك مقبض الإبرة ثم ضع الإبرة في اللهب لتسخينها وتسخين الجزء السفلي من مقبضها.



شكل (١) تسخين إبرة التلقيح في اللهب حتى الاحمرار وبعد التلقيح

وأثناء عملية نقل اللقاح امسك الأنبوبة باليد اليسرى وبواسطة أصابع اليد اليمنى أنزع غطاء الأنبوبة مع الحذر من إلقاء الغطاء، أو وضعه على المنضدة أثناء نقل اللقاح تكون الأنبوبة في وضع أفقي تقريبا ولا تتركها مفتوحة مدة أكثر من اللازم ويجب أن تمرر فوهات الأنابيب التي أخذت منها المزرعة أو التي نقلت إليها الميكروبات في لهب الموقد على الفور قبل وبعد إدخال الإبرة وإخراجها ثم تعطي الأنابيب وتوضع في حاملها وتعريض فوهة الأنبوبة للهب بالإضافة إلى أنه يبيد الميكروبات الموجودة على الفوهة فإنه يحلق تيارات حمل حرارية تقلل من احتمالات التلوث.



شكل(٢) يوضح الطريقة الصحيحة لمسك الأنابيب أثناء نقل المزارع

ونظرا لأن أغلب أعمال البكتريولوجيين تتم من خلال استعمال مزارع نقية لذلك فإنه يجب عليك أن تقدر مدى أهمية الطرق المستعملة في التلقيح الأمر الذي يحتم عليك أن تتقن هذه الطرق مبكرا من بداية المقرر العملي.

وعقب إجراء عملية التلقيح تحفظ المزرعة البكتيرية أو تحضن في وسط مناسب للنمو والمقصود هنا بالنمو growth هو: زيادة أعداد الخلايا من خلية واحدة أو من عدة خلايا قليلة وتصبح كتلة mass الخلايا الجديدة النامية مرئية للعين المجردة كتعكير في البيئة السائلة أو كمستعمرة على البيئة الصلبة ويستخدم مظهر النمو كوسيلة للتمييز بين أنواع الميكروبات.

والطريقة السهلة الشائعة لتحضير البيئة الصلبة هي إضافة مادة تصلب القوام إلى البيئة السائلة فتتصلب البيئة عندما تبرد. من أكثر المواد المصلبة للبيئة استعمالا ، هي مادة الآجار Agar والآجار مادة تستخرج من بعض الطحالب البحرية ، ومن السهل تداولها بالمعمل، ويمكن أن تتوفر بحالة جافة نقية ، وهي تضاف إلى البيئة السائلة قبل عملية التعقيم بالحرارة، وتحفظ البيئة الصلبية الناتجة في أنابيب اختبار ، أودوارق.

رغم أن أنواع الآجار المختلفة تختلف بدرجة كبيرة في خواصها الطبيعية ، إلا أنها تسيل عادة عند درجة ٩٧ : ١٠٠م وبذلك فإنه عند الاستعمال، يمكن تسييح بيئات الآجار الصلبة بالغليان. وتتصلب البيئة

المحتوية على الآجار عندما تبرد إلى حوالي ٤٢م. وتجرى عملية التلقيح قبل أن تتصلب البيئة على درجة ٤٥ : ٤٧م وهي درجة غير ضارة لأغلب أنواع البكتيريا إذا ما تعرضت لها لمدة قصيرة. وبعد تصلب البيئة الملقحة، فإنها تحضن على درجة الحرارة المطلوبة حتى درجة ٧٠م دون أن تسيل.

من الناحية الكيميائية فإن الآجار عبارة عن جلاكتان وهي مادة كربوهيدراتية معقدة تتكون من جزيئات الجالاكتوز، ولا تتعرض للتحلل بفعل أغلب أنواع البكيريا ويستعمل الآجار عادة بتركيز ١,٥٪ وعند استعمال طريقة التخطيط السطحي فإن تركيز ١,٨٪ يعطي بيئة أكثر صلابة أقل عرضة للحفر والتقطيع بالإبرة أثناء التخطيط.

لا يستعمل الآجار بالبيئة كمصدر غذائي، ولكن يستعمل فقط كعامل للتصليب. ومن العوامل المصلبة الأخرى التي يمكن استعمالها لأغراض معينة مادة الجيلاتين، التي تستعمل بتركيز ١٢ : ١٥٪ ويوجد الجيلاتين في الحالة السائلة عند درجة حرارة أعلى من ٢٥ ويتعرض للتحلل (الإسالة) بتأثير أنواع كثيرة من البكتيريا.

من المواد المصلبة أيضا مادة السليكا جل Silica gel وهي تستعمل في تنمية البكتيريا الأوتوتروفية، التي تتطلب أن تكون بيئتها خالية من المواد العضوية.

تهدف مجموعة التمارين التالية إلى تعريفك بأكثر أنواع البيئات المزرعية استعمالا (البويون، المرق المغذي والآجار المغذي) وكذلك استخداماتها في زراعة البكتيريا في نفس الوقت فإنك ستتعلم أسس نقل المزارع الميكروبية تحت شروط التعقيم وطرق عزل المزارع النقية وطرق عد الميكروبات.

صبغة جرام Gram stain

صبغة جرام صبغة تفريقية وتعتبر من أهم طرق الصبغ استعمالاً في البكتريولوجي فباستعمال هذه الطريقة يمكن تقسيم البكتيريا إلى مجموعتين موجبة لجرام gram-positive ، وسالبة لجرام gram-negative ويعتقد أن سبب الاختلافات في الصبغ بين هذين النوعين من الخلايا يعود إلى الاختلافات الموجودة في طبيعة وتركيب الطبقات السطحية أو جدر هذه الخلايا. عموماً .... فإن الخلايا

الموجبة أو السالبة لجرام تميل إلى التفاعل بدرجات مختلفة مع كثير من العوامل الفيزيائية والكيميائية. وتحتاج صبغة جرام لأربعة محاليل مختلفة:

أ) صبغة قاعدية Basic dye (الصبغة الأساسية).

ب) مرسخ Mordant .

ج) عامل مزيل للون Decolorizing agent .

د) صبغة مضادة Counterstain (الصبغة الثانية).

بالنسبة للصبغة القاعدية فقد سبق شرحها. أما المرسخ فهو عبارة عن مادة تزيد القابلية affinity، أو الجذب attraction بين الخلية والصبغة بمعنى أنها تساعد على ترسيب الصبغة وتثبيتها على سطح الخلية بطريقة ما. من أمثلة المرسخات الأحماض، القواعد، أملاح المعادن، واليود. وباستعمال المادة المرسخة فإن الخلية تصبغ بقوة كما أنه يصعب إزالة الصبغة منها.

العامل المزيل للون كما يبدو من اسمه عبارة عن مادة تزيل الصبغة من الخلية المصبوغة بعض الخلايا المصبوغة تزول صبغتها بسهولة أكثر عن خلايا أخرى وفي صبغة جرام وبعض الصبغات التفريقية الأخرى فإن التفرقة بين أنواع البكتيريا تعود إلى الاختلافات في سرعة إزالة الصبغات بين تلك الأنواع.

الصبغة المضادة هي: صبغة قاعدية تختلف في لونها عن لون الصبغة الأساسية المستعملة والغرض من استعمال الصبغة المضادة هو إعطاء الخلايا التي أزيلت منها الصبغة الأساسية لوناً يختلف عن لون الصبغة الأساسية وعلى ذلك .... فإن الخلايا التي لم تزل منها الصبغة الأساسية تحتفظ بلون الصبغة الأساسية، أما الخلايا التي أزيلت منها الصبغة الأساسية فإنها تأخذ لون الصبغة المضادة.

دعنا الآن نلخص طريقة الصبغ بصبغة جرام :

- تتضمن الخطوة الأولى صبغ الخلايا بغزارة بالصبغة القاعدية الأساسية.
- يتبع ذلك معاملة تلك الخلايا المصبوغة بمرسخ مثل : اليود.
- بعد ذلك تعامل الخلايا بعامل مزيل اللون مثل: الكحول.
- الخلايا التي ستحتفظ بالصبغة الأساسية عقب استعمال مزيل اللون تسمى موجبة لجرام.

- أما الخلايا التي زالت منها الصبغة الأساسية فتسمى سالبة لجرام وهذه يمكن إعادة صبغها بصبغة مضادة ذات لون مختلف. (انظر شكل ١)

طريقة العمل:

تستعمل مزارع حديثة العمر Young cultures عمرها ١٨ – ٢٤ ساعة، لأن مثل هذه المزارع مازالت تحتفظ بخواص تراكيب جدار الخلية، أما المزارع القديمة المسنة Old cultures فإنها تميل إلى فقد خاصية الصبغ الموجب لجرام.

١- جهز أغشية من كل من Bacillus cereus, Streptococcus faecalis وغشاء واحد خليط من Escherichia coli, Micrococcus luteus ثبت الأغشية بالحرارة.

٢- اصبغ بالكريستال البنفسجي لمدة ٣٠ ثانية.

٣- اغسل بالماء.

٤- غط الغشاء بمحلول اليود Grams iodine واتركه لمدة ٣٠ ثانية للتفاعل.

٥- اغسل بالماء.

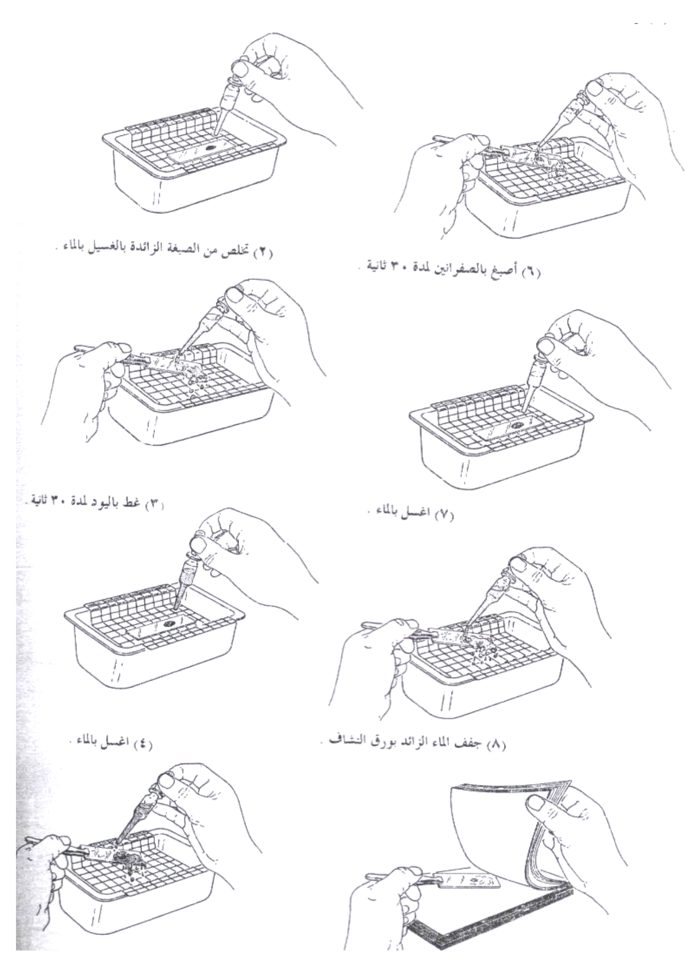
٦- أضف كحول ٩٥٪ لإزالة اللون، والغشاء الرقيق يكفيه من ١٠ – ٢٠ ثانية ويمكن أيضاً أن يضاف الكحول على الغشاء الرقيق نقطة نقطة مع إمالة الشريحة للأمام والخلف حتى يصير الكحول المتساقط من الشريحة عديم اللون.

٧- اغسل بالماء.

٨- اصبغ بالصبغة المضادة وهي الصفرانين لمدة ٢٠ – ٣٠ ثانية، ثم جفف الشريحة بورق النشاف ثم أعلى اللهب.

٩- افحص بالعدسة الزيتية، ثم ارسم ما تشاهده.

ماذا يحدث في كل خطوة من خطوات الصبغ بهذه الطريقة؟ إذا فحصت الخلايا الموجبة والسالبة لجرام عقب كل خطوة ستلاحظ النتائج المدونة في جدول (١).



شكل رقم (١٥) طريقة الصبغة بجرام

جدول (١) خطوات الصبغ بجرام

خطوات الصبغ	الطريقة	النتيجة	
		جرام موجب	جرام سالب
الصبغة الأساسية	كريستال بنفسجي لمدة ٣٠ ثانية	لون بنفسجي	لون بنفسجي
المرسخ	محلول اليود لمدة ٣٠ ثانية	يستمر اللون البنفسجي	يستمر اللون البنفسجي
إزالة لون الصبغة	كحول ٩٥٪ لمدة ١٠ – ٢٠ ثانية	يستمر اللون البنفسجي	غير ملون
الصبغة المضادة	صفرانين لمدة ٢٠ – ٣٠ ثانية	يستمر اللون البنفسجي	لون وردي

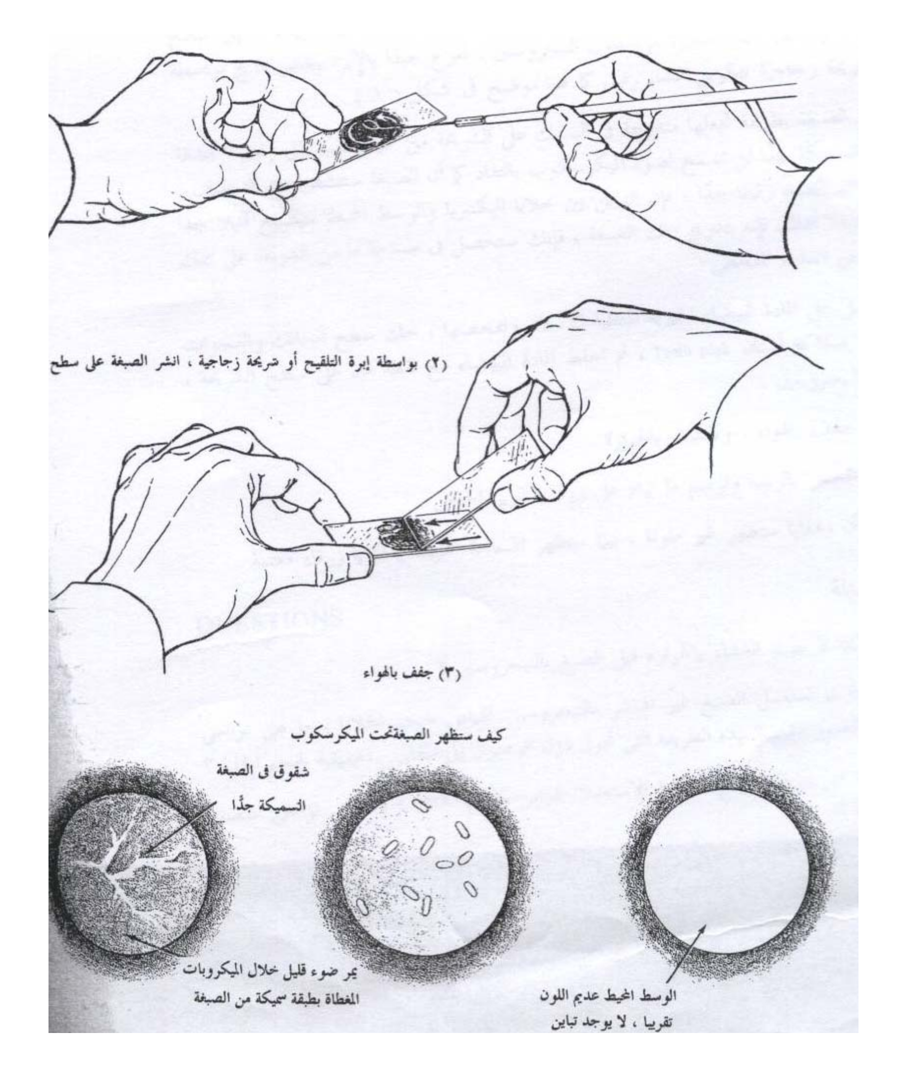
تفرق صبغة جرام البكتيريا إلى مجموعتين مختلفتين على أساس الفروق الموجودة في طبيعة جدارها الخلوي فبينما نجد أن الجدار الموجب لجرام في اغلب البكتيريا يتكون أساساً من طبقة سميكة من الببتيدوجلوكان Peptidoglycan ، نجد أن الجدار السالب لجرام يتركب من عدة طبقات Multilayered عبارة عن طبقة رقيقة من الببتيدوجلوكان محاطة بطبقات خارجية من البروتين والليبيدات وعديدة السكريات. والاختلاف بين نوعي البكتيريا في درجة نفاية هذه التركيبات السطحية للمحاليل المستعملة في صبغة جرام يسبب التفرقة في الصبغ.

الصبغ السالب أو غير المباشر Negative or Indirect Staining

يعتبر الأيوسين Eosin أحد أمثلة الصبغات الحامضية وهو يستعمل كصبغة في صورة ملحة الذائب المسمى إيوسينات الصوديوم Sodium eosinate عندما يتأين الملح يعطي أيونات صوديوم موجبة وأيونات صوديوم سالبة وإلى هذه الأيونات السالبة تعود قدرة الملح على التلوين ومن الأمثلة الأخرى للصبغات الحامضية مادة النيجروسين Nigrosine التي ستستعملها لصبغ بعض المزارع وصبغ جزء من المادة البيضاء المغطية للأسنان Teath tarter.

ماذا يحدث عند صبغ الغشاء الميكروبي بالصبغة الحامضية؟ حيث إن قدرة الصبغة على التلوين تعود إلى الأيون السالب والذي لن يتحد مع أخر سالب فإن الصبغة الحامضية لا تصبغ خلايا البكتيريا السالبة الشحنة وبديلاً عن ذلك فإن الصبغة الحامضية تكون راسباً حول الخلية وبذلك فإن الخلايا لا تصبغ ويظهر الميكروب شفافاً غير مصبوغ والذي يصبغ هو الشريحة التي تظهر ملونة لذلك فإن هذا النوع من الصبغ يسمى الصبغ السالب Negative staining أو بالصبغ غير المباشر Indirect staining (انظر الشكل ١).

رغم أن هه الطريقة من الصبغ غير شائعة الاستعمال في الأعمال البكتريولوجية إلا أن لها فائدة واحدة عن الصبغ المباشر فالصبغ غير المباشر يعطي صورة أكثر وضوحاً ودقة للخلية البكتيرية من حيث حجمها وشكلها.



شكل (١٦) الصبغة السالبة والغير مباشرة

طريقة العمل:

انقل عدد ٢ غمسة إبرة من المعلق البكتيري من كل مزرعة معزولة في تدريب ٧ إلى سطح الشريحة ثم أضف قطرة صغيرة من محلول النيجروسين. امزج جيداً وانشر المزيج بواسطة حافة شريحة زجاجية لتكوين غشاء رقيق كما هو موضح في شكل (١).

انشر الصبغة بطريقة تجعلها متدرجة في السمك على الشريحة من سميك نسبياً إلى رقيق فطبقة الصبغة السميكة جداً لن تسمح لضوء الميكروسكوب بالنفاذ كما أن الصبغة ستتشقق عند التجفيف، أما إذا كان الغشاء رقيقاً جداً فإن التباين بين خلايا البكتيريا والوسط المحيط سيصبح قليلاً جداً وغير كاف لذلك فإنه بتدرج سمك الصبغة فإنك تحصل في مساحة ما من الشريحة على سمك مناسب من الغشاء للفحص:

لتحصل على المادة البيضاء الجيرية المغطية للأسنان ولفحصها حك أسنانك والفجوات التي بينها بسلاكة أسنان Teeth pick ثم اخلط المادة البيضاء مع نقطة ماء على سطح الشريحة واصبغ بالنيجروسين.

٢- جفف بالهواء ولا تثبت بالحرارة.

٣- افحص بالزيتية وارسم ما تراه على ورق التقرير الخاص.

تذكر أن الخلايا ستظهر غير ملونة بينما المساحة المحيطة بالخلايا زرقاء معتمة.

أسئلة :

١- لماذا لا يثبت الغشاء بالحرارة قبل الصبغ بالنيجروسين؟

٢- إذا ما استعمل الصبغ غير المباشر بالنيجروسين لقياس حجم الخلايا ، ما هي نواحي القصور الخاصة بهذه الطريقة التي تحول دون الوصول إلى المقاييس الحقيقية لحجم الخلية؟

٣- ما هي طريقة الصبغ الشائعة الاستعمال لقياس حجم الخلايا؟ وما هي نواحي القصور بها؟

الصبغ المباشر بالصبغات القاعدية Direct staining with basic dyes

لكي نفهم كيف تقوم الصبغة بصبغ خلية البكتيريا يجب أن نعرف أولاً ما هي الصبغة. الصبغات Dyes هي بصفة عامة عبارة عن أملاح أحد أيوناتها ملون. الملح عبارة عن مركب يتكون من أيون موجب الشحنة وأيون سالب الشحنة فصبغة أزرق الميثيلين Methylene blue صبغة بسيطة عبارة عن كلوريد الميثيلين الأزرق والتي تتفكك Dissociate كالآتي:

كلوريد الميثلين الأزرق ←——— ميثلين أزرق + كلوريد .

ولون الصبغة هنا هو أيون الميثلين الأرز ذو الشحنة الموجبة.

وتحمل خلايا البكتيريا شحنات سالبة عندما يكون الرقم الأيدروجيني للوسط قريباً من التعادل وهو الوسط المعتاد غالباً لنمو البكتيريا وتتحد الخلايا البكتيرية ذات الشحنة السالبة مع أيون الميثيلين الأزرق الموجب الموجب الشحنة مما يؤدي إلى صبغ الخلية وعلى ذلك فالاختلافات في الشحنة هي التي تكون حالة قابلية الارتباط Affinity بين الصبغة وبين خلية البكتيريا.

تقسم الصبغات البكتيرية إلى مجموعتين: قاعدية وحامضية فإذا كان اللون يعود إلى الأيون الموجب في الصبغة (الكاتيون) فإنها تسمى صبغة قاعدية Basic dye ، وعلى ذلك فإن المثيلين الأزرق يعتبر صبغة قاعدية وإذا كان اللون يعود إلى الأيون السالب(الأنيون) ، فإن الصبغة تسمى صبغة حامضية Acidic dye.

في التدريب التالي ستحضر أغشية مصبوغة من المزارع التي عزلتها وكذلك من اللعاب Saliva

طريقة العمل:

تحضير وتثبيت التحضير البكتيري للصبغ

Preparation and fixation of bacteria for staining

قبل إجراء عملية الصبغ، عليك أن تثبت المادة التي ستفحصها بمعنى أن تلتصق المادة بسطح الشريحة التي ستصبغ عليها. وإذا لم يثبت التحضير فإن غشاء Film الخلايا سيزول من على الشريحة أثناء عملية الصبغ.

والطريقة العامة الموضحة في هذا التدريب تعتبر أساسية في معظم طرق الصبغ المستعملة للبكتيريا ففي هذا التدريب ستستعمل الحرارة لقتل الخلايا وتثبيتها على الشريحة.

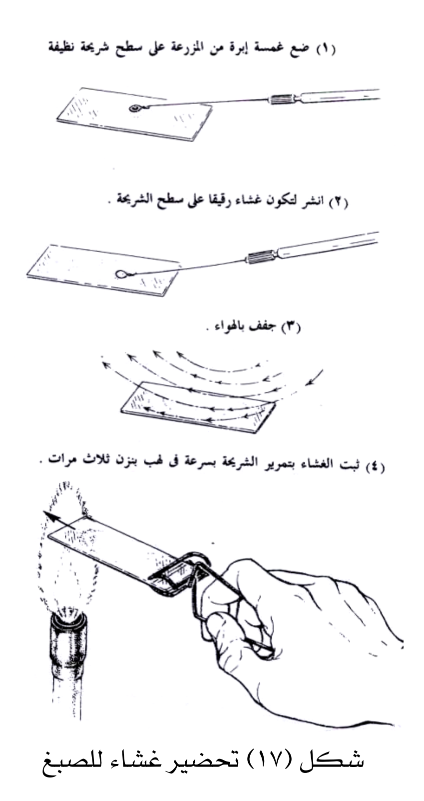
١- بواسطة الإبرة ذات العقدة ضع غمسة إبرة من كل مزرعة سائلة عزلتها على سطح شريحة نظيفة مستقلة وذلك لكل غمسة وفي حالة المزرعة الصلبة ضع نقطة ماء نظيفة في وسط الشريحة وامزج بها جيداً جزءاً صغيراً من المزرعة.

٢- انشر بالإبرة مزيج المزرعة الصلبة (أو غمسة المزرعة السائلة) على مساحة حوالي ١سم^{٢} بوسط الشريحة لتكون غشاء رقيقاً Thin film ومعظم الطلاب يقعون في خطأ تحضير غشاء سميك.

٣- اجمع بعض اللعاب في أنبوبة اختبار معقمة وبالإبرة المعقمة ذات العقدة انقل غمسة إبرة من اللعاب على سطح شريحة نظيفة وانشره لعمل غشاء رقيق.

٤- اترك الشريحة لتجف في الهواء أو بمسك الشريحة من أعلى اللهب بحوالي ٢٠سم بحيث لا يغلي الغشاء الموجود على الشريحة.

٥- بعد ذلك ثبت الغشاء المتكون بتمرير الشريحة في اللهب ثلاث مرات مراعياً وجود الغشاء على السطح العلوي.



شكل (١٧) تحضير غشاء للصبغ

يراعى في هذه الخطوة أن استعمال الحرارة أكثر من اللازم سيشوه شكل وتركيب الخلية المصبوغة لذا يجب أن تكون الشريحة دافئة وليست ساخنة ويعرف ذلك إذا وضعت الشريحة ظهر اليد.

والغرض من عملية تثبيت الغشاء هو قتل الكائنات الدقيقة وتجميع بروتوبلازم الخلية ولصق الغشاء بسطح الشريحة كما ذكر سابقاً.

والتثبيت النموذجي هو الذي يحفظ تركيبات الخلية في شكلها ووضعها الطبيعي دون حدوث تشوهات أو ظهور تركيبات لم تكن موجودة بالخلية الحية. وبينما يعتبر التسخين الهين أنسب الطرق استعمالاً لعملية تثبيت الغشاء فإن مواد أخرى مثل الكحول وبعض الكيميائيات قد تستعمل أيضاً. انظر شكل (١٧) الذي يوضح كيف تحضر غشاء للصبغ.

فحص البكتيريا الحية — Examination of living bacteria

كثير من أنواع البكتيريا الحية سريعة الحركة ونظرا لأنه من الصعب فحص البكتيريا غير المصبوغة لأن الخلايا اليكتيرية عديمة اللون ودرجة تباينها عن الوسط الذي تعيش فيه طفيفه إلا أنه

يمكن رؤية البكتيريا ومشاهدة حركتها باستعمال التحضيرات المبتلة والنقطة المعلقة Hanging-drop preparations كما ستفصل في الطريقة التالية:

افحص العرض الخاص بالبكتيريا الحية المتحركة وغير المتحركة التي أعدها مشرف المعمل ثم جهز تحضيرات من المزارع المقدمة لك ولاحظ الحركة.

طريقة العمل

٥. جهز تحضيرات بالطريقة المبتلة من مزارع

Pseudomonas aeruginosa, bacillus cereus, enterobacter aerogenes.

وذلك بوضع نقطة من كل مزرعة على كل شريحة بواسطة الإبرة ذات العقدة – بعد التغطية بغطاء الشريحة افحص الحركة بالعدسة الزيتية.

٦. جهز من نفس المزارع تحضيرات بطريقة النقطة المعلقة :

- ضع بواسطة قضيب زجاجي رفيع فازلين حول تجويف شريحة النقطة المعلقة.
- بواسطة إبرة التلقيح ذات العقدة المعقمة انقل مقدار نقطة واحدة من المزرعة وضعه في وسط غطاء الشريحة النظيفة.
- اقلب الشريحة ذات التجويف على غطاء الشريحة بحيث تقع نقطة المزرعة وسط تجويف الشريحة دون أن تلمسها وبالضغط الخفيف على جوانب غطاء الشريحة يلتصق الغطاء بالشريحة نتيجة لوجود الفازلين.

٧. بسرعة وعناية اقلب الشريحة ليكون الغطاء إلى أعلى والنقطة معلقة في وسط التجويف. لا تدع النقطة تسقط أو تلمس قاع التجويف.

٨. لفحص النقطة المعلقة ... عدل أولاً موضع النقطة بحيث ترى حافتها في وسط مجال النظر – كخط لامع متموج على خلفية رمادية – وذلك بتحريك الشريحة واستعمال القوة الصغرى وتقليل الضوء الداخل إلى الميكروسكوب بواسطة الحجاب.

انقل إلى القوة الكبرى ثم إلى الزيتية بتحريك القطعة الأنفية.

استعمل الضابط الدقيق حتى ترى حافة النقطة المعلقة بوضوح حيث تستطيع مشاهدة البكتيريا بحركتها وتباينها عن الوسط المحيط بها ، كما يراعى الاحتراس في التمييز بين الحركة الحقيقة والحركة البراونية. افحص العرض المجهز للحركة بواسطة الميكروسكوب المتباين الأطوار الضوئي.

أسئلة : Questions

٣- لماذا تضبط الرؤية أولاً على حافة النقطة المعلقة ولا تضبطها مباشرة على البكتيريا المعلقة بالنقطة؟

٤- لا تعود الحركة في كل أنواع الكائنات الدقيقة المتحركة إلى الفلاجلات ما هي أنواع الحركة الأخرى التي تستطيع وصفها؟

أمراض الدواجن

أمراض النقص الغذائي

تدريب عملي رقم (٣)

التدريب: أمراض نقص التغذية

الهدف :

٦) معرفة الإجراءات السليمة لتخزين الغذاء

٧) معرفة نسب تكوين العلائق الغذائية

٨) التعرف على أعراض أمراض التغذية

مدة التدريب :

(٨) ساعات.

الوسائل المساعدة :

- ملابس عمل مناسبة
- قلم وأوراق خاصة
- آلة حاسبة
- أدوات تشريح

طريقة العمل:

اولاً : زيارة احدى المشاريع القريبة وتدوين الاتي:

- عند دخولك للحظائر سجل الملحوظات التالية وناقشها مع مدربك:

٣٥. هل حركة الطيور داخل الحظيرة هادئة.

٣٦. اطلب من مشرف المزرعة مشاهدة موقع تخزين الاعلاف(مغطاء أو مكشوف لاشعة الشمس).

٣٧. هل يوجد طيور نافقة.

٣٨. هل يوجد طيور مجتمعة في ركن من الحظيرة ويبدو عليها الخمول.

٣٩. هل توجد طيور لا تستطيع الحركة.

٤٠. هل منقار الطيور تم قصه.

٤١. هل توجد جروح على جسم الطائر ناتجة من الافتراس.

٤٢. عدد الدجاج في البطارية الواحده.

٤٣. هل تقوم الطيور بحركات غير طبيعية.

٤٤. هل يوجد أي تغير في حجم الارجل أو وجود تورم.

٤٥. اسأل مشرف المشروع هل يوجد انخفاض في إنتاج البيض أو تشوهات به.

٤٦. هل يوجد طيور ذات تريش غير طبيعي.

٤٧. هل حويصلة الطيور ذات حجم طبيعي.

بعد تسجيلك لهذه الملحوظات ناقشها مع مدربك بعد الرجوع للاعراض المرضية التي سبق دراستها.

ثانياً: قم باخذ احد الطيور الغير سليمه أو التي يبدو عليها اعراض حركية من احد المشاريع لتشريحها وتدوين ملحوظاتك كالتالي:

- جهز مكان التشريح وخذ احتياطاتك للوقاية.
- احضر ادوات التشريح الخاصة بك.
- افحص الطائر مظهرياً وسجل ملحوظاتك الغير طبيعية على الطائر مثل (جروح – تضخم مفاصل ووتر – افرازات انفية - بثور .....الخ)
- قم بفتح بطن الطائر من اسفل المنقار الى منطقة المجمع اطلع على الاتي:

١٧. هل يوجد أي تغيرات على الجهاز التنفسي.

١٨. هل يوجد أي تغيرات على الجهاز الهضمي.

١٩. افحص الحويصله وتأكد من عدم تمزقها.

٢٠.هل يوجد تضخم بالكبد والطحال.

٢١.هل يوجد كدمات اسفل جلد الطائر

سجل جميع ملحوظاتك وناقشها مع مدربك، وتاكد من تخلصك من الطائر لاحقاً بطريقة صحيحة.

ثالثاً: زيارة احد مصانع العلائق بالمنطقة:

- زيارة أحد مشاريع الأعلاف مثل (أراسكو).
- التعرف على مصادر هذا الأعلاف.
- اسأل مسئول المصنع عن النسب الغذائية في العليقة (البروتين – الكربوهيدرات –الكالسيوم- ....الخ)
- التعرف على طرق التخزين المتبعة في المصنع .

أمراض الدواجن

الأمراض الطفيلية والفطرية

تدريب عملي رقم (٤)

التدريب: الأمراض الطفيلية والفطرية

الهدف :

٩) التعرف على الأمراض الأولية والفطريات

١٠) القدرة على إجراء المقارنات بين الأمراض الأولية والميكوبلازما والفطريات

١١) معرفة الإجراءات الصحية لتطهير المزارع بين الدورات

مدة التدريب :

(١٢) ساعة.

الوسائل المساعدة :

- ملابس عمل مناسبة
- قلم وأوراق خاصة
- أدوات تشريح
- مجهر
- مطهرات
- أدوات وأجهزة تنظيف حظائر الدواجن

طريقة العمل:

أولا : زيارة إحدى المشاريع القريبة أو سوق الدواجن بالمنطقة وتدوين الاتي :

- عند دخولك للحظائر سجل الملحوظات التالية وناقشها مع مدربك:

٤٨. هل يوجد هزال على الطيور.

٤٩. هل تشاهد وجود طيور برية أو قوارض أو قراد أو ذباب داخل الحظيرة.

٥٠. هل توجد فتحات في جدران الحظيرة.

٥١. اطلب من مشرف المشروع مشاهدة مكان تخزين العليقة ، وسجل ملحوظاتك.

٥٢. هل يوجد اسهالات في الحظيرة.

٥٣. هل حركة الطيور داخل الحظيرة هادئة.

٥٤. هل يوجد طيور نافقة.

٥٥. هل الطيور في نفس العمر ومن نفس الجنس(دجاج- فري- حمام)

٥٦. هل يوجد طيور مجتمعة في ركن من الحظيرة ويبدو عليها الخمول.

٥٧. هل الاضاءه داخل الحظيرة مناسب.

٥٨. هل رطوبة الحظيرة ودرجة حرارتها مناسبة.

٥٩. هل توجد رائحة واضحة داخل الحظيرة.

٦٠. هل توجد طيور لا تستطيع الحركة.

٦١. هل توجد جروح على جسم الطائر وخاصة فتحة المجمع.

٦٢. اسأل مشرف المشروع هل يوجد انخفاض في إنتاج البيض.

بعد تسجيلك لهذه الملحوظات ناقشها مع مدربك بعد الرجوع للاعراض المرضية التي سبق دراستها.

ثانياً: قم باخذ احد الطيور الهزيله أو التي يبدو عليها اعراض تنفسية أو اسهال من احد المشاريع لتشريحها وتدوين ملحوظاتك كالتالي:

- جهز مكان التشريح وخذ احتياطاتك للوقاية.
- احضر ادوات التشريح الخاصة بك.
- افحص الطائر النافق مظهرياً وسجل ملحوظاتك الغير طبيعية على الطائر مثل (جروح — افرازات انفية - بثور - قراد.....الخ)

- قم بفتح بطن الطائر من اسفل المنقار الى منطقة المجمع اطلع على الاتي:

٢٢. هل يوجد التهابات في الحنجرة والقصبه الهوائية أو طفيليات.

٢٣. هل يوجد أي تغيرات على الرئة.

٢٤. هل يوجد أي تغيرات على الجهاز الهضمي.

٢٥. هل يوجد تضخم بالكبد والطحال.

٢٦. أخذ عينة من البراز (الزرق) أو القشور الجلدية أو الريش.

٢٧. فحص هذه العينات تحت المجهر لرؤية مباشرة.

سجل جميع ملحوظاتك وناقشها مع مدربك، وتاكد من تخلصك من الطائر لاحقاً بطريقة صحيحة.

ثالثاً : زيارة احدى المزارع والمشاركة في عملية تطهيرها كالتالي :

يفضل القيام بعملية تطهير مزرعة متكاملة كالآتي:

١- بعد انتهاء دورة إنتاج يتم أخراج جميع الطيور في الحظيرة.

٢- يتم إخراج جميع التجهيزات في الحظيرة (المساقي، المعالف، أماكن وضع البيض،الإنارة) وتنظيف الوحدة وعلى انفراد تام.

٣- يتم إزالة الأوساخ والسياج في الحظائر.

٤- يتم غسيل الحظائر (الأرضية، والجدران، والأسقف) بالماء بدفع قوي للتأكد من إزالة جميع البقايا العضوية المتراكمة على اماكن مختلفة من الحظيرة

٥- يتم التخلص من الغذاء المتبقي وخاصة إذا حدث آثار غير مرغوب بها في الدورة السابقة.

٦- بعد التأكد من الخطوة ٢ ، ٣، ٤ ، يتم ادخال المعالف والمشارب وجميع التجهيزات للحظيرة ويتم اغلاق الحظيرة جيدا ثم يتم عملية التطهير كالآتي:

أ) يوزع الفورمالين في أنية متفرقة غير مقعرة على جميع ارجاء الحظيرة وبشكل متساوي

ب) يتم وضع برمنجانات البوتاسيوم مبتدأ بالأبعد عن الباب إلى الأقرب

ت) يتم اغلاق الحظيرة جيدا لمدة يومين إلى ثلاثة ايام

ث) يتم فتح الحظيرة للتهوية بعد ذلك لمدة يوم إلى يومين وإزالة الأنية.

ملحوظة يتم الانتباه لكون غاز الفورمالدهيد الناتج سوف يسبب الاختناق في حالة البقاء معه داخل الحظيرة.

٧- يتم ادخال الطيور للحظيرة كدفعة جديدة.

المراجع

١- أمراض الدواجن – خصائصها وسبل الوقاية منها د. منصور فارس حسين ود. سر الختم حسين – جامعة الملك سعود – (١٩٨٨م).

٢- الدواجن، رعاية، تغذية، علاج د. مصطفى فايز، محرم (١٤١٦هـ).

٣- نشرة الأمراض المكتشفة في المسالخ، وزارة الشؤون البلدية والقروية – أمانة مدينة الرياض د.خالد الظفر، د.إيهاب عبد المنعم د.مجدي عبدالرحمن.

٤- التشريح البيطري. د.عبدالستار جاسم الشيخلي ود.إبراهيم صالح (١٩٨٠م).

٥- دليل الإنتاج التجاري للدجاج – الجزء الأول- ماك نورث – الدار العربية للنشر والتوزيع، (١٩٨٨م).

٦- دليل الإنتاج التجاري للدجاج، الجزء الثاني (الرعاية، الأمراض، الوراثة) ماك نورث. الدار العربية للنشر والتوزيع، (١٩٨٩م).

٧- دواجن الشرق الأوسط وشمال أفريقيا. العدد (١٢٤) أكتوبر (١٩٩٥م) السنة السابعة عشرة.

٨- المجلة الزراعية – المجلد السادس والعشرون العدد الأول محرم (١٤١٦هـ) وزارة الزراعة والمياه.

٩- المجلة الزراعية – المجلد الرابع والعشرون العدد الثاني (١٤١٣ – ١٤١٤هـ).

١٠- دواجن الشرق الأوسط – السنة العشرون – العدد (١٤٢) (سبتمبر/أكتوبر) (١٩٩٨م).

١١- نشرة منتوجات شركة فارمر للصحة الحيوانية ١٩٨٤م الناشر (Meap).

١٢- (التفاعلات الدوائية) نشرة التوعية والإعلام رقم (١٩٠) (١٤١٩هـ). د.عاشور أحمد الجمال، وزارة الزراعة المياه.

١٣- البيطرة وصحة الحيوان – المؤسسة العامة للتعليم الفني والتدريب المهني – المعاهد الثانوية الزراعية الطبعة (١٤١٩هـ).

١٤- علم السموم والأدوية البيطرية – جامعة عمر المختار – الطبعة الأولى ١٩٩٦م.

(Hand Book For. Farmers, Srock Diseases BAYER (Veterinary Derpartment)

_ تدريب عملي رقم (١) الأمراض الفيروسية..١
_ تدريبعملي رقم (٢) الأمراض البكتيرية..٢٦
_ تدريب عملي رقم (٣)أمراض نقص التغذية..٤٨
_ تدريبعملي رقم (٤) الأمراض الطفيلية والفطرية..٥١